



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS EM TUMORES DE BEXIGA DE
BOVINOS

JOÃO DE BETTENCOURT BARCELOS COTA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutora Luísa Maria Freire Leal
Mateus
Vogais

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

Doutor José Manuel Antunes
Ferreira da Silva

ORIENTADOR

Doutora Maria da Conceição da Cunha
e Vasconcelos Peleteiro

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS EM TUMORES DE BEXIGA DE
BOVINOS

JOÃO DE BETTENCOURT BARCELOS COTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutora Luísa Maria Freire Leal
Mateus
Vogais

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

Doutor José Manuel Antunes
Ferreira da Silva

ORIENTADOR

Doutora Maria da Conceição da Cunha
e Vasconcelos Peleteiro

2011

LISBOA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria da Conceição Peleteiro, minha orientadora, que desde o início me cativou, despertando a minha atenção para esta área. Foi um grande privilégio poder aprender tanto com tão boa mestre. Muito obrigado pela oportunidade que me concedeu.

Ao Doutor Carlos Pinto, que sempre me acolheu nas minhas estadias em São Miguel, por ser um excelente exemplo do Médico Veterinário, e por todo o conhecimento partilhado.

Ao Professor Doutor Jorge Correia, pelos ensinamentos, disponibilidade e conselhos. Foi certamente um dos Professores com quem mais aprendi.

Ao Mestre Hugo Pissarra, pelos ensinamentos, disponibilidade e amizade, sempre pronto a ajudar.

À Doutora Tânia Carvalho, por toda ajuda na técnica de imuno-histoquímica e partilha de conhecimentos.

Ao Dr. Telmo Nunes, pelo apoio no tratamento estatístico dos resultados.

À Dra. Angela García Gonzalez, pela amizade e simpatia, nos meus últimos meses de estágio.

Ao Mestre Gonçalo Forjaz, pela gentil cedência das fotos.

À Dona Maria do Rosário, Dona Maria Augusta e Sandra Carvalho, por todo o apoio e simpatia ao longo da minha estadia pelo Laboratório.

Ao António Malta Reis e ao José Luís Castro, pela verdadeira companhia, amizade e paciência ao longo destes anos.

À minha família, pelo apoio incondicional.

Resumo

Cota, J. B. 2011. *Identificação de Proteínas Estruturais em Tumores de Bexiga de Bovinos.*

A Hematúria Enzoótica Bovina (HEB) é uma doença de evolução arrastada associada à ingestão do feto comum (*Pteridium aquilinum*), em que a principal característica é o desenvolvimento de tumores da bexiga. Esta doença é endémica em diferentes zonas do Globo onde se encontram condições favoráveis ao crescimento da planta, incluindo o Arquipélago dos Açores. Os objectivos do presente trabalho foram os de (i) pesquisar através de métodos de imuno-histoquímica a expressão das proteínas estruturais das células uroteliais, uroplaquina III (UPIII) e citoqueratina 7 (CK7), em carcinomas do urotélio da bexiga de animais afectados pela HEB, e a sua possível associação com o grau e estadio tumorais, (ii) pesquisar a expressão dos factores reguladores do ciclo celular Ciclina D1 e p53, e a sua possível associação com o grau e estadio tumorais, (iii) analisar o possível valor dos tumores da bexiga de bovinos como modelo para os tumores de bexiga de outros animais e dos humanos.

Os resultados demonstram que a expressão da UPIII é perdida em carcinomas do urotélio de alto grau e invasivos, tendo esta característica sido associada estatisticamente com estes dois parâmetros. Do mesmo modo, a perda da expressão de CK7 observada em carcinomas de alto grau e invasivos foi associada estatisticamente com ambos os parâmetros. A sobre-expressão da Ciclina D1 foi identificada em todos os graus e estadios tumorais, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas. Devido a problemas de ordem técnica a avaliação da sobre-expressão da p53 reduziu a casuística apenas a 4 casos, não sendo possível propor associações estatisticamente válidas.

Este trabalho traz novos dados que auxiliam na compreensão das alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento de tumores de bexiga de bovinos com origem no epitélio de transição, podendo ser utilizados no âmbito da Patologia Comparada, quer para os Animais Domésticos quer para o Homem.

Palavras Chave: Tumores de bexiga, Hematúria Enzoótica Bovina, proteínas estruturais, factores reguladores do ciclo celular, imuno-histoquímica,

Abstract

Cota, J. B. 2011. *Identification of Structural Proteins in Bovine Urinary Bladder Tumours.*

Bovine Enzoootic Hematuria (BEH) is a disease characterized by a chronic progress associated with the ingestion of bracken fern (*Pteridium aquilinum*), which main characteristic is the development of urinary bladder tumours. This disease is endemic in different parts of the World where the appropriate conditions are settled for bracken fern upgrowth, including the Azores Archipelago. The objectives of this research were (i) the characterization by immunohistochemical methods of the expression of the uroplakin III (UPIII) and cytokeratin 7 (CK7), which are structural proteins of the urothelium, in carcinomas of the urinary bladder of animals affected by BEH, and its possible association with tumour grade and stage, (ii) the survey of the altered expression of the cell cycle regulating factors Cyclin D1 and p53 and its possible association with tumour grade and stage, (iii) evaluation of the applicability of bovine urinary bladder tumours as a model for urinary bladder tumours in Domestic Animals and in Humans.

The results showed that loss of UPIII expression was seen in high grade and invasive urothelial carcinomas, and that this loss was statistically associated with both parameters. Similarly, the loss of CK7 expression was seen in high grade and invasive tumours and was statistically associated with high grade and invasion. The overexpression of Cyclin D1 was identified in urothelial carcinomas of all grades and stages and no statistical association was identified. Due to technical problems the evaluation of p53 overexpression was reduced to only 4 cases. Therefore, it was not possible to draw statistical significant associations.

This research brings new data to the understanding of urinary bladder tumours allowing a better knowledge of the molecular changes involved and may be useful in the framework of Comparative Pathology, either for Domestic Animals or Humans.

Keywords: Urinary bladder tumours, Bovine Enzoootic Hematuria, structural proteins, cell cycle regulating factors, immunohistochemistry,

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	VIII
Índice de Tabelas	XI
Índice de Abreviaturas e Símbolos	XII
1. Relatório de Actividades	1
2. Introdução	3
2.1. Hematúria Enzoótica Bovina	3
2.1.1. Implicações da HEB na bovinicultura açoriana	4
2.2. <i>Pteridium aquilinum</i> e as suas toxinas	5
2.2.1. O ptaquilósido	6
2.3. Tumores de bexiga na HEB	7
2.4. HEB e os papilomavírus	8
2.5. Tumores de bexiga nos Animais Domésticos	11
2.6. Tumores de bexiga no Homem	12
2.7. Classificação dos tumores de bexiga	13
2.8. Monitorização dos tumores de bexiga no Homem	16
2.9. Alterações genéticas associadas aos tumores de bexiga	17
2.10. Factores reguladores do ciclo celular	19
2.10.1. P53	19
2.10.2. Ciclina D1	21
2.11. Proteínas estruturais	22
2.11.1. Uroplaquina III	22
2.11.2. Citoqueratina 7	23
3. Objectivos	25
4. Materiais e Métodos	26
4.1. Colheita de Amostras	26
4.2. Imuno-histoquímica	27
4.3. Análise estatística	28
5. Resultados	29
5.1. Aspectos microscópicos	29
5.2. Imuno-histoquímica	29
5.2.1. UPIII	29
5.2.2. CK7	29

5.2.3. Ciclina D1	30
5.2.4. P53	30
6. Discussão	37
7. Conclusão	42
8. Referências Bibliográficas	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Animais apresentando Hematúria nas abegoarias do Matadouro Industrial da Ilha de São Miguel (Foto cedida por Gonçalo Forjaz)	4
Figura 2 – <i>Pteridium aquilinum</i> . Ilha Terceira, Açores (Original)	5
Figura 3 – Tumor de bexiga de bovino abatido no Matadouro Industrial da Ilha de São Miguel (Foto cedida por Gonçalo Forjaz)	8
Figura 4 – Representação esquemática do genoma viral do BPV-1. As setas indicam as proteínas codificadas. Os genes L1 e L2 codificam as proteínas da cápside, e os genes E1-E8 codificam as proteínas não estruturais, expressas logo após a infecção. (Adaptado de Parrish, 2011).	9
Figura 5 – Representação esquemática dos eventos que conduzem ao desenvolvimento de tumores de bexiga induzidos pelos papilomavirus bovinos tipo BPV-2 actuando sinergicamente com as toxinas do feto comum (Adaptado de Borzacchiello & Roperto, 2008)	10
Figura 6 – Representação esquemática da classificação TNM de 1997 dos carcinomas da bexiga (Fonte: N. M. Luis <i>et al.</i> , 2007)	16
Figura 7 – Vias moleculares propostas para o desenvolvimento e progressão dos tumores do urotélio da bexiga. Os tumores do urotélio são separados em 2 grupos, com diferentes padrões histopatológicos, moleculares e comportamentos clínicos (Adaptado de Castillo-Martin <i>et al.</i> , 2010)	19
Figura 8 – Representação esquemática proposta da topologia trans-membranar das uroplaquinas bovinas (Fonte: Sun <i>et al.</i> , 1996)	23
Figura 9 – Diferentes tipos de tumores epiteliais da bexiga de bovino. a) Papiloma do urotélio com delicado estroma fibro-vascular (H & E). b) Carcinoma exofítico não invasivo do urotélio TaG1 (H & E).	31
Figura 10 – Carcinoma do urotélio da bexiga de bovino T1G1. a) O carcinoma ultrapassa a membrana basal, invadindo o estroma formando placas de células neoplásicas (H & E). b) Pormenor de a) (H & E).	31
Figura 11 – Carcinoma invasivo do urotélio da bexiga de bovino T1G2. a) O carcinoma invade a lâmina própria formando agregados, sob a forma de cordões de células neoplásicas moderadamente diferenciadas (H & E). b) Pormenor de a) (H & E).	31
Figura 12 – Carcinoma invasivo do urotélio da bexiga de bovino T1G3.	

- a) Carcinoma não papilar invadindo em profundidade a lâmina própria, com destruição do urotélio normal (H & E). b) Pormenor de a), exibindo ausência de organização das células neoplásicas pouco diferenciadas (H & E). 32
- Figura 13** – Carcinoma do urotélio com invasão muscular T2G3. a) O carcinoma penetra na profundidade da parede da bexiga até à camada muscular (H & E). b) Pormenor de a) mostrando as células neoplásicas pouco diferenciadas que invadem os feixes de fibras musculares (H & E). 32
- Figura 14** – Carcinomas do urotélio com invasão muscular da bexiga de bovino T2G4. a) As células neoplásicas invadem a camada muscular, destruindo os feixes musculares (H & E). b) Pormenor de a) mostrando fibras musculares destruídas pelas células neoplásicas indiferenciadas (H & E). 32
- Figura 15** – Papiloma do urotélio da bexiga de bovino. a) Marcação citoplasmática intensa para CK7. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. a) Marcação para UPIII no pólo apical das células uroteliais mais superficiais. ImmPRESS-peroxidase e Hematoxilina de Mayer. 35
- Figura 16** – Carcinoma do urotélio da bexiga de bovino T1G3. a) Marcação de fraca intensidade para CK7 das células uroteliais neoplásicas. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. b) Marcação heterogénea para UPIII nas células neoplásicas do mesmo campo. ImmPRESS-peroxidase e Hematoxilina de Mayer. 35
- Figura 17** – Carcinoma do urotélio de bexiga de bovino T2G2. a) Ausência de marcação para CK7 nas células neoplásicas, mantendo-se a marcação nas células normais na superfície do órgão. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. b) Maior ampliação da mesma neoplasia, mostrando um campo semelhante. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. 35
- Figura 18** – a) e b) Expressão atípica da UPIII em carcinomas do urotélio T1G3. Marcação difusa, por vezes granular, com ausência de polaridade. ImmPRESS-peroxidase e Hematoxilina de Mayer. 36
- Figura 19** – Carcinoma do urotélio da bexiga de bovino T2G3. a) Forte marcação nuclear para Ciclina D1 numa grande percentagem das células neoplásicas. ImmPRESS-peroxidase e Hematoxilina de Mayer. b) Pormenor da marcação nuclear para Ciclina D1. ImmPRESS-peroxidase e Hematoxilina de Mayer. 36
- Figura 20** – Carcinoma do urotélio da bexiga de bovino T2G4. a) Marcação nuclear da maioria das células neoplásicas para p53 num carcinoma do urotélio

invadindo o músculo. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. b) Pormenor da marcação nuclear para p53. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. (Fotos cedidas por Tânia Carvalho).

36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Factores de Risco associados ao desenvolvimento de tumores de bexiga em Humanos (Adaptado de Sharma <i>et al.</i> , 2009)	13
Tabela 2 – Classificação TNM dos carcinomas de bexiga (Adaptado de Sobin <i>et al.</i> , 1997)	15
Tabela 3 – Anticorpos, métodos de recuperação antigénica e sistema de revelação utilizados	27
Tabela 4 – Classificação histológica e caracterização imuno-histoquímica dos carcinomas do urotélio da bexiga de bovinos	33
Tabela 5 – Imunorreactividade da UPIII, CK7 e Ciclina D1 em relação ao grau e estadio dos carcinomas do urotélio da bexiga de bovinos	34

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E DE SÍMBOLOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BPV	Papilomavírus bovino
BPV-1	Papilomavírus bovino tipo 1
BPV-2	Papilomavírus bovino tipo 2
BTA	Bladder tumour antigen
CMH	Complexo Maior de Histocompatibilidade
CDK	Quinases dependentes da ciclina
CK	Citoqueratina
CK7	Citoqueratina 7
CK20	Citoqueratina 20
FGFR3	Receptor do factor de crescimento dos fibroblastos
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
H&E	Hematoxilina e Eosina
HEB	Hematúria Enzoótica Bovina
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MS	Matéria seca
NMP	<i>Nuclear matrix protein</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>open reading Frame</i>
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF-Rβ	Receptor β do factor de crescimento derivado das plaquetas
PI3	Fosfatidilinositol 3
PIK3CA	Subunidade catalítica alfa da fosfatidilinositol-3-quinase
PNLMP	Neoplasia papilífera de baixo potencial de malignidade
Pta	Ptaquilósido
TCC	Carcinoma do epitélio de transição
UP	Uroplaquina
UPIII	Uroplaquina III
VEGF	Factor de crescimento do endotélio vascular
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. RELATÓRIO DE ACTIVIDADES

O estágio curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária decorreu entre 6 de Setembro de 2010 e 28 de Fevereiro de 2011, no Laboratório de Anatomia Patológica, Departamento de Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Durante este período as actividades desenvolvidas incidiram em três áreas principais: o ensino, o diagnóstico e a investigação científica.

Ensino: Foi efectuado o acompanhamento dos vários docentes da disciplina de Anatomia Patológica II ao longo do primeiro semestre do ano lectivo 2010/2011 na sua componente prática, participando na execução de necrópsias e no auxílio aos alunos durante a realização das mesmas;

Diagnóstico: O estágio envolveu as actividades ligadas à rotina laboratorial de processamento de tecidos biológicos para exame histopatológico, e do material de necrópsia. Esta consistiu no exame macroscópico, com a respectiva descrição, para processamento das peças remetidas para análise, seu corte ao micrótomo, englobando a inclusão dos fragmentos em blocos de parafina, corte e coloração para posterior diagnóstico microscópico.

Foi igualmente acompanhada a realização de punções aspirativas por agulha fina (PAAF) e biópsias de pele na consulta do Hospital Escolar da F.M.V. às terças-feiras de manhã, e o seu posterior diagnóstico microscópico. Os diagnósticos a partir de esfregaços enviados para o laboratório por parte da Consulta Externa do Hospital da F.M.V. e de Centros de Atendimento Veterinário foram igualmente objecto de acompanhamento;

Investigação científica: Aplicação do método de imuno-histoquímica no âmbito da identificação de proteínas estruturais do epitélio de transição da bexiga, bem como de outras proteínas e factores reguladores do ciclo celular, para avaliação da sua alteração no decurso do processo de transformação neoplásica dos carcinomas do urotélio de animais afectados pela Hematúria Enzoótica Bovina, recorrendo a diversos anticorpos, protocolos e sistemas de marcação, tendo esta actividade constituído o projecto de investigação final. Com o objectivo de aprofundar os conhecimentos científicos na área do projecto final, decorreu participação no “Workshop on Ptaquiloside Toxicity” realizado na Ilha de São Miguel, Açores, no final do mês de Agosto de 2010, o qual foi da maior importância, possibilitando contactos com os investigadores nacionais e internacionais mais relevantes no estudo dos efeitos da ingestão do feto comum (*Pteridium aquilinum*) e da sua principal toxina, o ptaquilósido.

No total, nos 6 meses de estágio curricular foram efectuadas 105 necrópsias, das quais 48 foram executadas em cadáveres de cães (*Canis familiaris*), 33 em cadáveres de gatos (*Felis catus domesticus*), perfazendo 77% (81/105) das necrópsias seguidas. Estes casos foram posteriormente acompanhados nos vários passos até ao diagnóstico final. Foram igualmente seguidos 410 casos de exames histopatológicos de peças provenientes do Hospital Escolar e de Centros de Atendimento Veterinário, desde a recepção do material no laboratório até ao diagnóstico final, e 360 casos de exames citológicos.

O acompanhamento do processo de diagnóstico nos exames histopatológicos e citológicos constituiu grande parte da experiência acumulada ao longo dos 6 meses de estágio. Foi também possível desenvolver o espírito crítico e científico devido à grande base científica em que se apoia a área da Anatomia Patológica.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Hematúria Enzoótica Bovina

A Hematúria Enzoótica Bovina (HEB) é uma doença dos bovinos e búfalos de água, causada pelo consumo prolongado do feto comum (*Pteridium aquilinum*), caracterizada pela presença intermitente de sangue na urina (Dawra & Sharma, 2001). Este é o sinal clínico mais evidente da doença, o qual está muitas vezes associado com a presença de tumores na bexiga. O progresso da afecção é lento e assume comportamento crónico. Considera-se necessário um período mínimo de 2 anos para o desenvolvimento da doença, sendo a maioria dos casos diagnosticada entre os 4 e 6 anos idade (Dawra & Sharma, 2001). Em mais de 90% dos casos, a hematúria tem origem nos tumores da bexiga, mas esta pode surgir em animais sem neoplasia, estando associada a cistite ou hiperplasia da mucosa (Carvalho, 2007). Outras características clínicas para além da hematúria intermitente são referidas, tais como leucopénia, anemia e níveis reduzidos de hemoglobina (Dawra & Sharma, 2001). À medida que a doença vai progredindo, a hematúria pode cessar completamente, surgindo novamente após algumas semanas ou meses (Dawra & Sharma, 2001). Na fase terminal da doença os bovinos apresentam grande quantidade de coágulos de sangue na urina, levando muitas vezes ao bloqueio do fluxo urinário, principalmente nos machos devido às características anatómicas inerentes à uretra. Estes bloqueios podem conduzir a outros problemas tais como cistite, pielonefrite, hidronefrose, conduzindo ocasionalmente à morte dos animais antes destes serem transportados até ao matadouro (Pinto, 2010). A perda de condição corporal, podendo chegar a caquexia, a anemia grave e a hipoproteínémia são responsáveis pelo edema sub-mandibular muitas vezes observado quando se executa o exame físico a estes animais. Por vezes, na fase terminal da doença é possível palpar por via rectal massas sólidas de dimensões consideráveis na parede da bexiga (Dawra & Sharma, 2001). As áreas da bexiga onde surge o maior número de tumores são as paredes laterais e ventral do fundo, e a zona do trígono, as quais contactam mais persistentemente com a urina (Pinto, 2005).

2.1.1. Implicações da HEB na bovinicultura açoriana

Estima-se que a Hematúria Enzoótica Bovina custe mais de 650 000 euros por ano ao Governo Regional da Região Autónoma dos Açores, pelo pagamento de compensações financeiras aos produtores com animais portadores de neoplasias, e em pagamento de seguros quando os bovinos são aprovados para abate no exame *ante-mortem* no matadouro (Pinto, 2010). As perdas que resultam da HEB para os bovinicultores açorianos são causadas pelo refugo precoce dos animais com perda de produção leiteira, morte dos animais mais afectados, perda do valor da carne, custos da assistência médico-veterinária e do controlo do feto através da aplicação de herbicidas. Outros custos indirectos são de considerar, os quais são difíceis de contabilizar, devido à reprovação para consumo humano de um elevado número de animais portadores de tumores de bexiga, transmitindo uma má imagem das fileiras de produção de carne e leite açorianas perante os consumidores (Pinto, 2010).



Figura 1 – Animais apresentando Hematúria nas abegoarias do Matadouro Industrial da Ilha de São Miguel (Foto cedida por Gonçalo Forjaz)

2.2. *Pteridium aquilinum* e as suas toxinas

O feto comum (*Pteridium aquilinum*) é uma das cinco espécies de Plantas mais abundantes no Planeta (Smith & Seawright, 1995). Esta planta infestante está largamente disseminada por várias pastagens da Ilha de São Miguel e outras do Arquipélago dos Açores (Pinto *et al.*, 2000; Silva, 2001; Pinto, 2004). De entre os vários metabolitos com efeitos patogénicos que nela existem, salientam-se uma tiaminase, uma toxina para a medula óssea (Evans, 1976; Evans, 1986) e o glicósido sesquiterpenóide, o ptaquilósido (Pta) com capacidades mutagénicas, clastogénicas e cancerígenas (Niwa *et al.*, 1983; Van der Hoeven *et al.*, 1983). Os bovinos demonstram maior apetência pela ingestão dos rebentos e frondes tenras da planta (Bringuier & Jean-Blain, 1987), que são as porções onde se encontram níveis mais elevados de Pta (Smith *et al.*, 1993; Smith, 1997).



Figura 2 – *Pteridium aquilinum*. Ilha Terceira, Açores. (Original)

Foram descritas cinco síndromes em Ruminantes e Monogástricos domésticos associadas ao consumo de *Pteridium spp.* (Smith, 1990; Smith, 1997): (i) encefalomalácia por deficiência em tiamina, (ii) síndrome hemorrágica aguda ou intoxicação aguda pelo feto comum, (iii) retinopatia em Ovinos, ou “cegueira brilhante”, (iv) carcinomas do tubo digestivo, e (v) finalmente hematúria enzoótica nos Bovinos. O processo tóxico que se desenvolve está dependente de vários factores como a biomassa disponível de feto, a concentração de toxinas,

a fase de crescimento da planta, a época do ano, a quantidade ingerida e a duração do consumo, a espécie animal, o sexo e a idade (Smith & Pinto, 2006).

A hematúria enzoótica é assim denominada devido às características clínicas, e epidemiológicas, como sejam a presença de sangue na urina, o carácter endémico e a identificação de múltiplos tumores na mucosa da bexiga. Estes tumores têm duas origens, epitelial e mesenquimatosa, sendo os tumores desta última origem principalmente vasculares, originando as hemorragias que caracterizam a afecção (Carvalho *et al.*, 2006; Smith & Pinto, 2006).

2.2.1. O ptaquilósido

Em 1984, foi isolada pela primeira vez, a partir do feto comum, a molécula do ptaquilósido (Hirono *et al.*, 1984). Mais tarde, notou-se que a administração experimental por via oral de *Pteridium spp.* conduziu ao desenvolvimento de carcinomas da bexiga em ratos, porquinhos da Índia e em bovinos (IARC, 1986). Quando estudado isoladamente, a administração oral de Pta produziu em ratos tumores mamários e intestinais (IARC, 1986). Posteriormente a sua capacidade carcinogénica foi apoiada por outros estudos, induzindo tumores mamários, intestinais e da bexiga em ratos, de acordo com o que já tinha sido proposto (Hirono *et al.*, 1987; Shahin *et al.*, 1998). Os efeitos biológicos do Pta ao nível do ADN serão muito semelhantes aos provocados por agentes alquilantes clássicos (Povey *et al.*, 1994). Quando esta molécula se encontra em condições alcalinas moderadas converte-se em dienona, a qual possui capacidade de formar ligações covalentes (aductos) com as bases de ADN através de uma reacção electrofílica, ou, em alternativa, formar pterosina B inactiva (Smith *et al.*, 1994). Esta formação de aductos com o ADN pode culminar em alterações irreversíveis na célula, constituindo a primeira fase, de iniciação do processo neoplásico (Miller & Miller, 1986). Os órgãos frequentemente afectados são a nasofaringe e esófago dos bovinos, a bexiga dos herbívoros e o íleo dos roedores, onde normalmente se encontram condições alcalinas, necessárias para o desenvolvimento do processo anteriormente descrito (Van der Hoeven 1983; Smith & Seawright, 1995). No início dos estudos, outros compostos presentes no feto comum foram propostos como agentes carcinogénicos, nomeadamente a quercitina (Pamukcu *et al.*, 1980; Hirono *et al.*, 1981). No entanto, esta hipótese foi posteriormente rejeitada, já que não foi possível obter resultados que suportassem a teoria de que a quercitina possuísse características carcinogénicas (Pamukcu *et al.*, 1980; Saito *et al.*, 1980; IARC, 1983; Stoewsand *et al.*, 1984; Wargovich, Eng, & Newmark, 1985; Zhu, Ezell & Liehr, 1994; Formica *et al.*, 1995; citados por Stopper *et al.*, 2005).

2.3. Tumores de bexiga na HEB

Os primeiros estudos histopatológicos relacionados com a Hematúria Enzoótica Bovina remontam à década de 60 do século XX, em dois países diferentes, Quênia e Índia (Mugera & Nerito, 1968; Nandi, 1969). Em 1976, um estudo mais complexo foi liderado por Pamukcu, utilizando uma amostra de 139 casos de tumores de bexiga em bovinos expostos naturalmente ao feto comum, e em 30 animais alimentados experimentalmente com a planta. Dos animais aos quais foi fornecido o feto comum, 20 desenvolveram tumores de bexiga num prazo que nalguns casos chegou aos 5,3 anos. Os papilomas surgiram em animais 1 ano após o início da alimentação com feto comum, e os carcinomas mais invasivos mais tarde, aos 2,6 anos. Nos casos expostos naturalmente 35% tinham origem epitelial, 10% mesenquimatosa e 55% origem mista, epitelial e mesenquimatosa (Pamukcu *et al.*, 1976). Posteriormente, outros dados foram publicados a partir de estudos conduzidos em países como a China, Turquia, Bolívia, Austrália e Brasil (McKenzie, 1978; Xu, 1992; Ozkul & Aydin, 1996; Marrero *et al.*, 2001; Peixoto, 2003;).

Em todos os trabalhos realizados, parte dos bovinos afectados apresentava mais do que um tumor de bexiga, por vezes sendo de origens diferentes, tanto epitelial como mesenquimatosa. Contudo, a percentagem mais frequente dos tumores destes dois tipos, varia entre autores. Estas variações de resultados obtidos podem ser atribuídas às diferenças relacionadas com as áreas geográficas, espécies de feto consumido, ou ainda a critérios utilizados na recolha e classificação das amostras de bexigas nos matadouros (Carvalho, 2007).

Num estudo de 2006, realizado em Portugal, foram colhidas amostras de 433 bovinos adultos, reprovados para consumo humano devido a lesões na bexiga no Matadouro Industrial da Ilha de São Miguel. Devido a muitas das bexigas apresentarem mais do que uma lesão suspeita, 1337 fragmentos de lesões independentes foram processados para histopatologia, tendo sido identificados 870 tumores. As restantes lesões identificadas eram de carácter não neoplásico, correspondendo a hiperplasias e processos inflamatórios. Os tumores de origem epitelial perfizeram 62% do total das neoplasias identificadas, sendo que os restantes 38% eram de origem mesenquimatosa (Carvalho, Pinto & Peleteiro, 2006).

Segundo dados não publicados do Matadouro Industrial da Ilha de São Miguel, a frequência de metastização, principalmente para os linfonodos inguinais profundos, era patente em 5% dos casos (Carvalho, 2007).

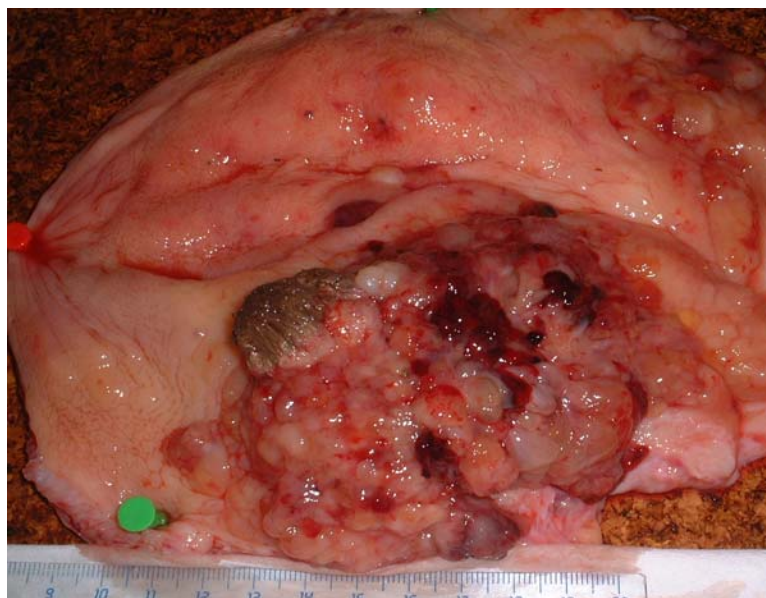


Figura 3 – Tumor de bexiga de bovino abatido no Matadouro Industrial da Ilha de São Miguel (Foto cedida por Gonçalo Forjaz)

2.4. HEB e os papilomavírus bovinos

O papel do papilomavírus bovino como participante activo no desenvolvimento de tumores de bexiga foi proposto pela primeira vez por Olson e os seus colegas, em 1965. Desde então, outros estudos relacionaram o papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2) e a exposição ao feto comum, com os tumores de bexiga que surgiam naturalmente, bem como os induzidos experimentalmente (Campo *et al.*, 1992). Os papilomavírus são vírus de ADN oncogénicos que afectam uma grande variedade de animais, incluindo o Homem, infectando em especial os epitélios cutâneo e das mucosas, originando lesões proliferativas benignas, vulgarmente denominadas verrugas (zur Hausen & de Villiers, 1994).

Até há alguns anos atrás, apenas tinham sido identificados 6 tipos de papilomavírus bovinos (BPV), distribuídos por 2 sub-grupos de acordo com as suas características (Campo, 1997). Nos últimos anos foram identificados outros 4 tipos, BPV-7 a BPV-10 (Tomita *et al.*, 2007; Claus *et al.*, 2008; Hatama *et al.*, 2008).

Na grande maioria dos casos estas lesões estão sob o controlo imunológico do hospedeiro e regridem espontaneamente. No entanto, se houver influência de outros factores, as lesões podem sofrer transformação maligna. Pensa-se que os compostos imunodepressores e carcinogénicos presentes no feto comum actuariam sinergicamente com o vírus, facilitando a progressão do papiloma para carcinoma (Campo *et al.*, 1992; Roperto *et al.*, 2009). Campo e os seus colegas, em 1992, conduziram o primeiro estudo em que esta relação entre vírus e feto comum foi demonstrada na génese da HEB. O ADN do BPV-2 foi identificado em 69% dos

tumores de bexiga induzidos experimentalmente, e em 46% dos tumores de desenvolvimento natural, independentemente do tipo histológicos dos mesmos (Campo *et al.*, 1992). Outros autores se seguiram nestes estudos, pesquisando também eles a presença de ADN do BPV-2. Em 2003, um estudo demonstrou a presença do ADN do vírus em causa em 77% dos tumores de bexiga de bovinos, e em 50% das bexigas sem qualquer tipo de lesões (Borzacchiello *et al.*, 2003). No Brasil, o BPV-2 foi detectado não só nas bexigas, como também nas amostras de sangue retiradas a bovinos com hematúria enzoótica (Wosiacki *et al.*, 2005). Nos últimos anos vários foram os autores que identificaram o BPV-1 e BPV-2 em tumores de bexiga de ocorrência natural, bem como em amostras de bexigas sem lesões (Benevides *et al.*, 2006; Balcos *et al.*, 2008; Resendes *et al.*, 2010). Recentemente, na Ilha de São Miguel, pesquisou-se a presença de ADN de BPV-1 e BPV-2 em 300 bexigas de bovinos. Deste total, 200 apresentavam neoplasias, das quais 41,5% revelaram positividade aos BPV-1 e 2. Nas restantes 100 bexigas-controlo, sem lesões, a positividade foi encontrada em 43% (Pinto, 2010). Estes dados estão de acordo com o facto de as infecções por papilomavírus poderem ser latentes, sub-clínicas e persistentes, podendo constituir um factor que conduz à formação de tumores benignos (Roperto *et al.*, 2009).

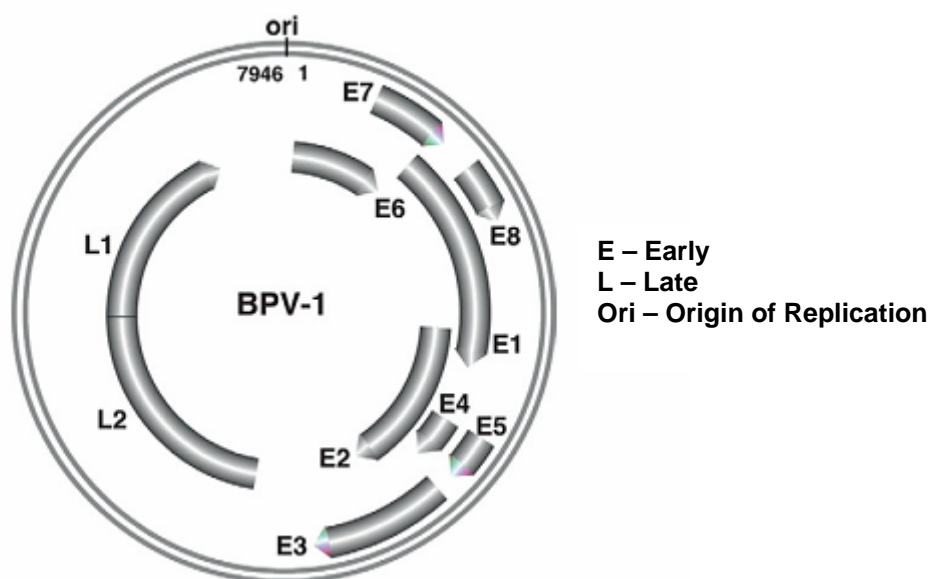


Figura 4 – Representação esquemática do genoma viral do BPV-1. As setas indicam as proteínas codificadas. Os genes L1 e L2 codificam as proteínas da cápside, e os genes E1-E8 codificam as proteínas não estruturais, expressas logo após a infecção. (Adaptado de Parrish, 2011).

O genoma viral dos BPV contém aproximadamente 10 ORF (*open reading frames*), as quais são classificadas como “early” E, iniciais, ou “late” L, tardias (Howley & Lowy, 2007). A região E codifica as proteínas reguladoras, incluindo as necessárias para a replicação inicial do ADN viral. As ORF L1 e L2 codificam as proteínas da cápside viral e são expressas

apenas nas infecções que conduzem à formação de lesões papilomatosas (Howley & Lowy, 2007).

A expressão da oncoproteína E5, a proteína do BPV-1 e 2 com capacidades oncogénicas mais importante, tem sido estudada em tumores de bexiga de bovinos por vários autores (Borzacchiello *et al.*, 2003; Borzacchiello *et al.*, 2006; Balcos *et al.*, 2008; Borzacchiello *et al.*, 2009; Resendes *et al.*, 2010). As proteínas E5 dos papilomavírus são polipeptídeos curtos hidrofóbicos, com uma estrutura helicoidal α , comum aos vários papilomavírus (Borzacchiello & Roperto, 2008). Dada a reduzida dimensão desta oncoproteína julga-se que a sua capacidade para induzir a transformação neoplásica não será através de reacções enzimáticas (Borzacchiello *et al.*, 2006). A E5 activa receptores de factores de crescimento e várias quinases, incluindo as CDK, e diminui a expressão do CMH tipo I (Campo, 2002). A interacção desta proteína com o receptor β do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF-R β) induz a transformação celular *in vitro* e *in vivo* nos carcinomas do urotélio em bovinos (DiMaio *et al.*, 2000; DiMaio & Mattoon, 2001; Borzacchiello *et al.*, 2006). O papel da E7 na carcinogénese da bexiga ainda está pouco investigado, sendo necessários mais estudos *in vivo* para maior esclarecimento do processo (Borzacchiello *et al.*, 2009).

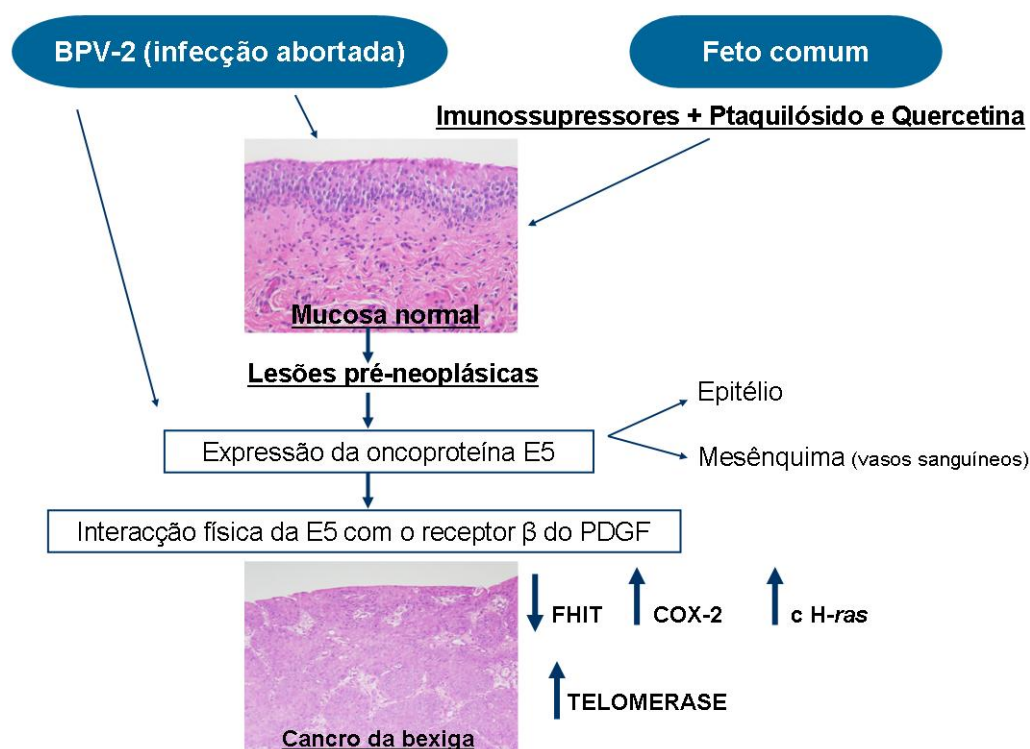


Figura 5 – Representação esquemática dos eventos que conduzem ao desenvolvimento de tumores de bexiga induzidos pelos papilomavirus bovinos tipo BPV-2 actuando sinergicamente com as toxinas do feto comum (Adaptado de Borzacchiello & Roperto, 2008)

Os vírus, no seu estado de latência, poderão ser activados pela acção dos carcinogénios químicos e/ou os componentes imunossuppressores encontrados no feto comum, permitindo a expressão dos genes virais (Borzacchiello *et al.*, 2003; Borzacchiello *et al.*, 2006; Borzacchiello & Roperto, 2008). Esta hipótese vai de encontro aos resultados obtido por Pinto em 2010, o qual sugere que as infecções pelo BPV serão insuficientes para o desencadeamento de neoplasias de bexiga sem a intervenção de outros carcinogénios (Pinto, 2010). Este mesmo autor considera 3 tipos de factores etiológicos na génese da Hematúria Enzoótica Bovina: (i) a toxicidade pelo feto comum, (ii) o stress oxidativo, devido a carências de oligoelementos, (iii) e a influência dos vírus da papilomatose bovina (Pinto, 2010).

2.5. Tumores de bexiga nos Animais Domésticos

As neoplasias do tracto urinário inferior são pouco comuns nos Animais Domésticos, ocorrendo na maioria das vezes em cães, gatos e em bovinos, existindo pouco dados para outros animais. Os tumores de bexiga representam menos de 1% de todos os tumores em canídeos, sendo a frequência ainda menor em gatos (Maxie & Newman, 2007). Em alguns estudos parece estar demonstrada maior incidência em fêmeas do que em machos no caso dos cães, embora outros estudos indiquem o oposto, como nos humanos. Raças como Scottish Terrier, Shetland Sheepdog, Beagle e Collie parecem estar em maior risco, quando comparadas com outras (Maxie & Newman, 2007). A maior susceptibilidade da bexiga para a ocorrência de tumores em relação a outros segmentos do tracto urinário pode estar relacionada com a exposição prolongada da mucosa aos carcinogénios (Maxie & Newman, 2007).

Na maioria dos casos, os tumores de bexiga são de crescimento lento e de metastização tardia. As neoplasias da bexiga podem ser causadas por uma variedade de substâncias químicas industriais (como a benzidina, e os metabolitos do triptofano), irritação crónica, corpos estranhos (como suturas) vírus, feto comum, e a ciclofosfamida. As concentrações mais elevadas de metabolitos de triptofano na urina do cão, comparando com as presentes na urina do gato, podem contribuir para uma maior frequência de tumores de bexiga em cães (Maxie & Newman, 2007).

A maioria dos casos de tumores de bexiga em cães (97%) e em gatos (80%) consiste em tumores malignos e de origem epitelial, sendo na generalidade carcinomas do epitélio de transição (TCC). Estas neoplasias surgem maioritariamente na zona do trígono da bexiga em cães (Meuten, 2002). Os TCC são normalmente invasivos a nível local, podendo invadir para além da parede da bexiga, atingindo órgãos adjacentes como a próstata, vagina, útero ou recto. Este tipo de tumor é capaz de metastizar tanto a nível local (linfonodos ilíacos mediais e

hipogástricos), bem como à distância (pulmão, fígado, baço). Estas metástases podem estar presentes em valores que chegam aos 50% dos casos no momento de diagnóstico (White, 2003).

As síndromes paraneoplásicas associadas aos tumores de bexiga incluem hipercalcémia, caquexia, hiperestrogenismo, osteopatia hipertrófica, e policitémia (White, 2003).

Não existem muitos relatos de neoplasias de bexiga em cavalos, e nestes casos o carcinoma de células escamosas é o mais comum, estando também descritos casos de carcinoma do epitélio de transição, pólipos fibromatosos, rabdomiossarcoma e linfoma (Meuten, 2002)

2.6. Tumores de bexiga no Homem

O cancro da bexiga ocupa o quinto lugar das neoplasias mais comuns nos países industrializados, perfazendo 5% de todos os tumores em humanos (Schulz, 2006). Está estimado que todos os anos surgem mais de 300 000 casos novos nos países industrializados, e em áreas onde a infecção por *Schistosoma haematobium* é endémica.

A maioria dos casos não relacionados com esta infecção parasitária corresponde a carcinomas do epitélio de transição (Knowles, 2006). Nos Estados Unidos da América os tumores de bexiga tomam a segunda posição das neoplasias genito-urinárias mais frequentes, sendo estimados 69 000 casos novos diagnosticados em 2008, e 14 000 mortes relacionadas com a doença (Kaufman, Shipley & Feldman, 2009). Estas neoplasias têm origem no urotélio, o epitélio de transição altamente especializado que integra a mucosa da bexiga. Os homens apresentam uma incidência 3 vezes maior do que as mulheres, e este tumor afecta principalmente pessoas idosas (Crallan, 2006; Knowles, 2006). Esta predisposição parece estar correlacionada com os androgénios e os seus receptores, envolvidos na promoção da proliferação celular (Miyamoto *et al.*, 2007). O tabagismo é um dos principais factores de risco associados aos tumores da bexiga (Silverman *et al.*, 1992; Brennan *et al.*, 2000; Brennan *et al.*, 2001). Outros carcinogénios ocupacionais estão também descritos, como a benzidina (Silverman *et al.*, 1992). A irritação crónica do órgão pode também predispor ao aparecimento de tumores de bexiga (Silverman *et al.*, 1992; Eble, 2004).

Tabela 1 – Factores de Risco associados ao desenvolvimento de tumores de bexiga em Humanos (Adaptado de Sharma *et al.*, 2009)

Factores Comportamentais

Tabagismo;

Factores Ambientais

Arsénico na água;

Factores Inflamatórios

Cálculos na bexiga, infecção crónica, tuberculose genito-urinária, permanência prolongada de cateteres urinários, *Schistosoma haematobium*;

Factores Iatrogénicos

Ciclofosfamida, radioterapia pélvica;

Factores Ocupacionais

Exposição a aminas aromáticas usadas no fabrico de corantes químicos, produtos farmacêuticos e em estações de tratamento de gás;

Fabrico de cabos, vidro, tintas, pneus, têxteis, borracha, petróleo;

Profissões como cabeleireiros, pintores, camionistas, construção de estradas;

2.7. Classificação dos tumores de bexiga

A maioria dos casos de tumores de bexiga em humanos (90%) tem como origem o urotélio, sendo denominados carcinomas do urotélio ou carcinomas do epitélio de transição. A restante percentagem corresponde a outros tipos, como os adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas (Eble, 2004).

A classificação dos tumores de bexiga baseia-se em vários parâmetros os quais devem ser meticulosamente avaliados. Estes parâmetros são: padrão de crescimento, o grau de atipias nucleares e o estadio do tumor.

Os carcinomas podem apresentar diferentes padrões de crescimento: papilar, infiltrativo, *in situ* ou uma combinação dos diferentes padrões (Mostofi, 1999). Os carcinomas *in situ* são lesões não papilares compostas por células de baixo grau de diferenciação, mas que não invadem a membrana basal, podendo atingir, ou não, toda a espessura do epitélio de transição que recobre internamente a bexiga. Os papilomas uroteliais são tumores papilares benignos, compostos por um delicado estroma fibrovascular coberto por um urotélio indistinguível do urotélio normal da bexiga (Mostofi, 1999). Em 2004, este sistema de classificação foi melhorado pela admissão de novos tipos: a neoplasia papilífera de baixo potencial de malignidade (PNLMP), e os carcinomas papilares de baixo e de alto grau (Eble, 2004).

O sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde diferencia os carcinomas do urotélio de acordo com a organização estrutural e os vários graus de atipias nucleares numa escala de G1 a G4 (Mostofi, 1999). Qualquer tumor é classificado de acordo com a área com o grau mais alto. O epitélio dos carcinomas do urotélio de grau 1 é composto por células bem diferenciadas, tendo uma organização semelhante à do epitélio normal, apresentando no entanto diferenças facilmente identificáveis, como a variação da polarização nuclear, núcleos mais volumosos e de formato irregular. Os carcinomas de grau 2 apresentam um grau de atipia intermédio, sendo compostos por células moderadamente diferenciadas. Os carcinomas do urotélio de grau 3 apresentam o epitélio com uma grande desorganização estrutural, composto por células pouco diferenciadas, chegando a ser formados por células indiferenciadas nos casos dos carcinomas de grau 4. Estes tumores menos diferenciados possuem comportamento mais agressivo.

Para além do padrão e do grau, a invasão do estroma pelas células neoplásicas deve ser avaliada. Segundo o sistema de classificação TNM de 1997, cada tumor em causa é classificado de acordo com a profundidade de invasão da parede da bexiga, bem como a presença de metástases nos linfonodos regionais, ou em outros órgãos, resumido na Tabela 2 (Sobin *et al.*, 1997).

Mais de 70% dos casos de tumores de bexiga em humanos, quando da apresentação clínica são carcinomas papilíferos de baixo grau, não apresentando invasão da membrana basal (Ta). Apesar da elevada percentagem de recidivas após ressecção trans-uretral (60-75%), o prognóstico é bom devido à baixa frequência de metástases e aos tratamentos que preservam o órgão, sendo que apenas em 10 a 15% dos casos as neoplasias progridem para tumores invasivos (Baffa *et al.*, 2006; Knowles, 2008).

Os restantes 30% são tumores que já invadiram a muscular própria (T2), ou outros com invasão da membrana basal (T1) (Knowles, 2008). A sobrevivência dos portadores baixa drasticamente para 53% nos casos T2, 39% nos casos T3 e 25% nos casos T4, devido à elevada probabilidade de ocorrência de metástases (El-Gabry *et al.*, 2000; citado por Baffa *et al.*, 2006).

Tabela 2 – Classificação TNM dos carcinomas de bexiga (Adaptado de Sobin *et al.*, 1997)

T – Tumor Primário

TX – O tumor primário não pode ser avaliado

T0 – Não existe tumor primário

Ta – Carcinoma papilar não invasivo

TIS – Carcinoma *in situ*

T1 – O tumor invade o tecido conjuntivo sob o epitélio (camada superficial)

T2 – O tumor invade o músculo

T2a – Camada muscular mais superficial afectada (metade interior)

T2b – Camada muscular mais profunda afectada (metade exterior)

T3 – O tumor invade o tecido adiposo adjacente à bexiga

T3a – microscópicamente

T3b – macroscópicamente (a massa tumoral é visível na superfície externa da bexiga)

T4 – O tumor invade uma das seguintes estruturas/órgãos: próstata, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal

N – Linfonodos Regionais

NX – Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 – Não existe metástase no linfonodo regional

N1 – Metástase num único linfonodo com dimensão < 2 cm

N2 – A dimensão da metástase num único linfonodo é > 2 cm, mas < 5cm, ou metástases em diferentes linfonodos com dimensões < 5cm

N3 – Metástase num único linfonodo com dimensão > 5 cm

M – Metástases Distantes

MX – As metástases distantes não podem ser avaliadas

M0 – Não existem metástases distantes

M1 – Existem metástases distantes

Estadio 0a – Ta, N0, M0

Estadio 0is – Tis, N0, M0

Estadio I – T1, N0, M0

Estadio II – T2a, N0, M0; T2b, N0, M0

Estadio III – T3a, N0, M0; T3b, N0, M0; T4a, N0, M0

Estadio IV – T4b, N0, M0; Qualquer T, N1, M0; Qualquer T, N2, M0; Qualquer T, N3, M0; T, Qualquer N, M1

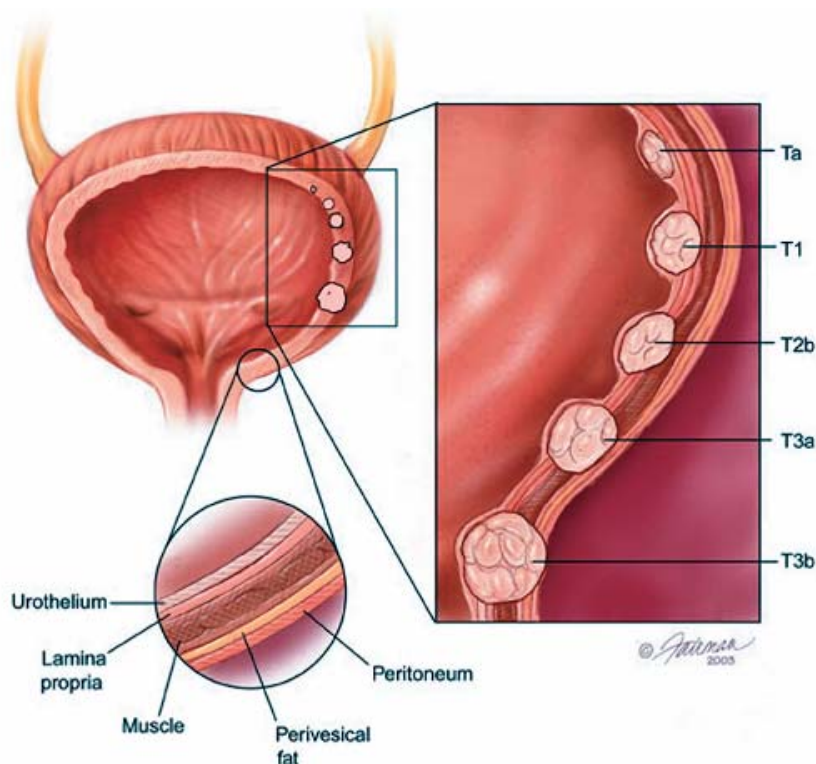


Figura 6 – Representação esquemática da classificação TNM de 1997 dos carcinomas da bexiga (Fonte: N. M. Luis *et al.*, 2007)

2.8. Monitorização dos tumores de bexiga no Homem

A cistoscopia, a citologia a partir de urina de colheita livre, e os estudos imagiológicos são os padrões em vigor para detecção e monitorização das neoplasias da bexiga em Medicina Humana (Mitra & Cote, 2010). A cistoscopia é um exame com sensibilidade elevada para a maioria dos tumores, mas apresenta algumas limitações, como a probabilidade de não se identificar pequenos tumores planos como carcinomas *in situ* (Budman, Kassouf & Steinberg, 2008). Após ser detectada a lesão no urotélio, o diagnóstico e o estadiamento são obtidos por ressecção por via trans-uretral (Kaufman, Shipley & Feldman, 2009). Infelizmente, a cistoscopia é um procedimento invasivo e dispendioso (Van, Veenstra & Isaaq, 2011). Por outro lado, a citologia urinária é um exame não invasivo, com uma especificidade elevada, porém com uma sensibilidade baixa para tumores de baixo grau bem diferenciados (Budman *et al.*, 2008). Ou seja, o exame citológico não pode substituir a cistoscopia, ou ser um recurso para prolongar os intervalos entre cistoscopias, funcionando sim como um adjuvante para detectar tumores ocultos (Budman *et al.*, 2008).

Devido às desvantagens destes exames, procuram-se outros métodos não invasivos para a detecção e vigilância do cancro de bexiga (Budamn *et al.*, 2008). Idealmente, um teste para rastrear uma doença deve ter sensibilidade e especificidade elevadas, não ser invasivo, ser

padronizado, ser reprodutível, acessível economicamente, e fácil de executar (Van *et al.*, 2011). Nos últimos anos, muito se tem discutido sobre o contributo dos marcadores tumorais presentes na urina para o diagnóstico e vigilância dos tumores de bexiga (Sharma *et al.*, 2009). A escolha do marcador depende do objectivo final, ou seja, prevenção, rastreio, vigilância, ou previsão do comportamento da neoplasia (Rao, 1999; citado por Sullivan *et al.*, 2010). Testes como o BTA-stat (*bladder tumor antigen*) ou o NMP22 (*nuclear matrix protein*) são bons exemplos de marcadores utilizados na vigilância do cancro de bexiga, disponíveis comercialmente, fornecendo dados qualitativos em poucos minutos, podendo ser executados por um Técnico de Saúde mesmo sem formação específica nos testes em causa (Yutkin *et al.*, 2010). Apesar da intensa pesquisa de testes fiáveis não invasivos, que substituam o acompanhamento dos doentes por cistoscopia, até à data nenhum deles foi capaz de substituir os procedimentos de rotina (cistoscopia associada a citologia), devido ao grande risco de não se conseguir identificar alguns tumores de alto grau (Yutkin *et al.*, 2010).

2.9. Alterações genéticas associadas aos tumores de bexiga

As diferentes alterações genéticas encontradas em tumores papilíferos de baixo grau e em tumores invadindo as camadas musculares demonstram que existem, pelo menos, duas vias principais para o desenvolvimento de tumores de bexiga. Estes dois grupos foram definidos com base nas diferentes frequências de mutações do gene *TP53* e nas deleções no cromossoma 9 (Spruck *et al.*, 1994). Acredita-se que estas alterações genéticas sejam o ponto de partida para um dos dois tipos de comportamento tumoral: o crescimento papilífero ou o carcinoma *in situ* e posterior invasão dos tecidos adjacentes (Baffa *et al.*, 2006).

Os tumores papilíferos de baixo grau possuem elevada frequência de deleções no cromossoma 9 como factor desencadeador, mas baixa percentagem de mutações da proteína p53. Nos tumores não invasivos de baixo grau em humanos as deleções no cromossoma 9, as “point mutations” no receptor do factor de crescimento dos fibroblastos (FGFR3) e na subunidade catalítica alfa da fosfatidilinositol-3-quinase (PIK3CA) são as alterações genéticas mais comuns (Knowles, 2008). Mais de 50% de todos os tumores de bexiga, independentemente do grau ou estadio, possuem alterações neste cromossoma. Todos os dados apontam para que os genes presentes no cromossoma 9 participem nos passos iniciais do desenvolvimento tumoral (Gibas *et al.*, 1984; Fadl-Elmula *et al.*, 2000; Knowles, 2008). A hiperplasia do urotélio pode representar um precursor do desenvolvimento de carcinomas papilíferos de baixo grau, embora esta relação não seja linear (Knowles, 2008). Foram encontradas deleções no

cromossoma 9 em 70% das amostras de bexiga que apresentavam hiperplasia do urotélio, através dos métodos FISH (fluorescence *in situ* hybridization) e por análise de perda de heterozigotia (LOH) (Hartmann *et al.*, 1999; Obermann *et al.*, 2003).

Inversamente, os carcinomas *in situ* e o urotélio com displasia apresentam muitas mutações na proteína p53, mas baixas percentagens de deleções no cromossoma 9 (Baffa *et al.*, 2006). Em humanos foi identificada uma grande variedade de alterações genómicas nos carcinomas do urotélio com invasão muscular. Além das deleções no cromossoma 9, outras alterações foram encontradas nestes carcinomas invasivos. Foram identificadas perdas cromossómicas do 1q, 6q, 9p, 9q e 13q, e ganhos no 5p em mais de 15% dos carcinomas invasivos do urotélio (Knowles, 2006). Muitos foram os estudos onde se pesquisou a expressão dos genes supressores tumorais *RBI* e *TP53*, os quais se encontram alterados na maioria destes tumores. O envolvimento do gene *TP53* constitui a diferença mais notável entre os tumores com invasão muscular e os não invasivos de baixo grau (Fujimoto *et al.*, 1992; Spruck *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1995). Muitas mutações foram já descritas para o gene *TP53*, bem como outras alterações que perturbam a via de sinalização da proteína p53, entre as quais a sobre-expressão do HDM2 e a perda da expressão da proteína p21 que foram descritas em carcinomas invasivos do urotélio em humanos (Stein *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2002). As mutações no gene *PTEN* associadas às mutações do *TP53* são das mais frequentes nos tumores humanos, e a sua inactivação em conjunto assume um papel importante no desenvolvimento tumoral. Estudos recentes demonstraram a importância da inactivação conjunta destes genes nos tumores de bexiga com invasão muscular (Puzio-Kuter *et al.*, 2009).

O gene *CCND1* que codifica a Ciclina D1 está amplificado em alguns tumores, tanto nos superficiais como nos invasivos. No entanto, a percentagem de amplificação é insuficiente para explicar todos os casos de sobre-expressão. Esta sobre-expressão pode reflectir outras alterações, como a activação das vias da MAPK ou da PI3 (Knowles, 2006). As alterações genéticas associadas à Ciclina D1 têm sido identificadas em tumores em fases iniciais, contribuindo para o desenvolvimento tumoral na bexiga e estão associadas a recidivas em casos de tumores superficiais (Baffa *et al.*, 2006).

Outras alterações nos cromossomas 3p, 8p, 11p, 13q, e 17q em carcinomas do urotélio foram também identificadas e associadas a um comportamento mais agressivo e com tendência para metastizar (Gonzalgo *et al.*, 2000; citado por Baffa *et al.*, 2006).

Sugere-se então que os tumores com invasão da camada muscular tenham origem em displasias da mucosa, que por sua vez dão origem a carcinomas *in situ*, a partir dos quais se

desenvolveriam tumores com comportamento invasivo. Os tumores papilíferos de baixo grau, por outro lado, poderão ter origem na hiperplasia do urotélio com atipias mínimas, levando ao crescimento de uma estrutura papilífera, seguida por resposta angiogénica (Knowles, 2008).

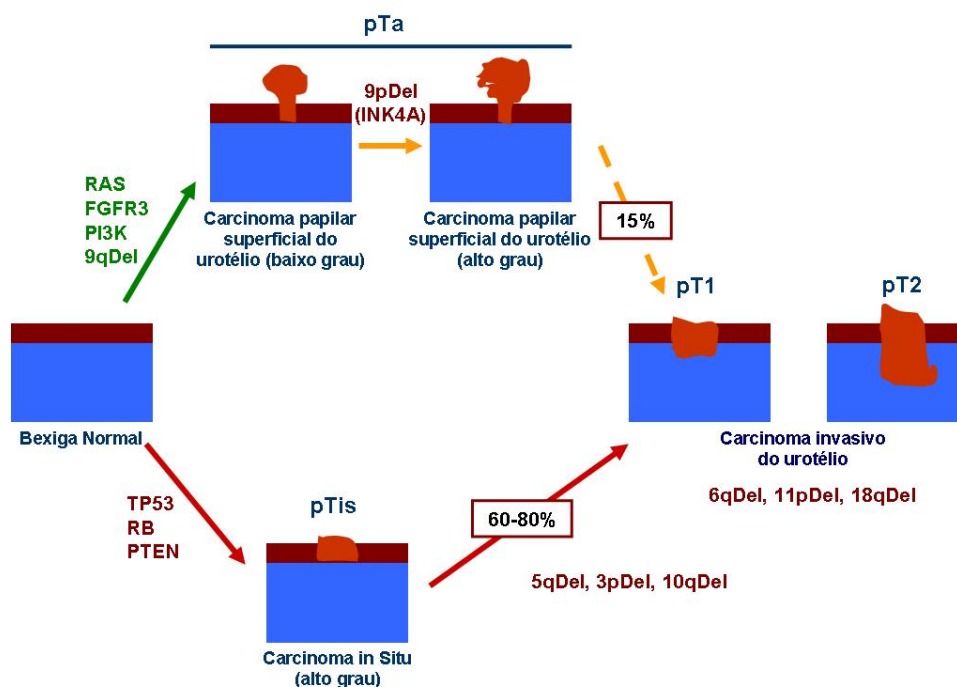


Figura 7 – Vias moleculares propostas para o desenvolvimento e progressão dos tumores do urotélio da bexiga. Os tumores do urotélio são separados em 2 grupos, com diferentes padrões histopatológicos, moleculares e comportamentos clínicos (Adaptado de Castillo-Martin *et al.*, 2010)

Apesar da grande quantidade de informação de índole molecular sobre os tumores de bexiga ainda não foi possível deduzir um modelo da patogénese molecular capaz de englobar todos os grupos de tumores do urotélio da bexiga. Idealmente, as análises genómicas deveriam ser associadas a análises de expressão molecular de modo a obter-se informações abrangentes dos passos do desenvolvimento e progressão tumorais (Knowles, 2008).

2.10. Factores reguladores do ciclo celular

2.10.1. P53

O gene supressor tumoral *TP53*, localizado no cromossoma 17p13.1, codifica a proteína p53, fulcral no controlo do ciclo celular (Mitra *et al.*, 2006). A expressão de p53 provoca várias respostas celulares, incluindo a suspensão do ciclo celular, senescência, diferenciação ou apoptose, dependendo de muitos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos à célula (Vousden & Lu, 2002). Em resposta a estímulos de *stress* celular, como lesões no ADN,

hipóxia, choque de calor, alterações metabólicas, ou exposição a certas citocinas, o gene codificador da p53 é activado, levando à acumulação da proteína no núcleo, iniciando cascatas moleculares que terminam na suspensão do ciclo celular ou na apoptose (Hall, Meek & Lane, 1996). Este aumento dos níveis da proteína p53 leva ao bloqueio do ciclo celular na fase G₀/G₁, permitindo que os mecanismos de reparação do ADN tenham tempo para corrigir os erros (Lane, 1994). No entanto, na maioria dos casos, a indução da p53 leva a uma inibição irreversível da proliferação celular, culminando na apoptose (Vousden & Lu, 2002). Assim a activação da p53 é fundamental para o destino da célula que se encontra num ambiente adverso (Slaton, Benedict & Dinney, 2001). A p53 tem outras funções tais como controlar a angiogénese, através da produção do factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Controla ainda o factor de crescimento dos fibroblastos (*basic fibroblast growth factor*), limitando assim o crescimento tumoral pelo controlo da neovascularização induzida pelo tumor (Dameron *et al.*, 1994; Nishizaki *et al.*, 1999). A perda da função desta proteína conduz à propagação de células com defeitos genéticos e constitui um passo-chave no desenvolvimento de neoplasias (Lane, 1994).

As mutações no gene da p53 são encontradas em 50 a 55% de todos os tumores humanos (Hollstein *et al.*, 1994). Os tumores de bexiga não são excepção, tendo sido já descritas 270 mutações diferentes associadas aos carcinomas do urotélio (Olivier *et al.*, 2002). A proteína p53 no seu estado normal tem um tempo de semi-vida de 6 a 30 minutos. Pelo contrário, a proteína mutada apresenta um tempo de semi-vida de muitas horas devido à sua estabilização metabólica, sendo esta a base para a sua detecção pelos métodos de imuno-histoquímica (Esrig *et al.*, 1993). A correlação entre as mutações e a acumulação nuclear da p53 mutada é muito boa, mas não é perfeita no caso dos tumores de bexiga em humanos, devido a algumas dificuldades da própria técnica de imuno-histoquímica (Schulz, 2006).

Estudos recentes indicam que a acumulação da proteína p53 mutada está associada com um comportamento tumoral mais agressivo (Goebell *et al.*, 2010). Estes dados vêm de encontro ao que já se tinha proposto. A acumulação da p53 constitui um factor de prognóstico, estando relacionada com a progressão da doença, e com menores taxas de sobrevivência em humanos (Esrig *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2009). O gene *TP53* continua a ser um dos mais estudados no caso dos tumores de bexiga em humanos, mas com diferentes resultados no que diz respeito ao seu uso como um marcador de prognóstico (Baffa *et al.*, 2006). As questões metodológicas como diferenças entre protocolos de imuno-histoquímica e a sua interpretação, bem como amostras de tamanho inadequado são apontadas como factores para as discordâncias entre estudos (Goebell *et al.*, 2010).

Estudos pesquisando a acumulação da p53 mutada em tumores de bovinos, através de métodos de imuno-histoquímica foram já publicados (Carvalho *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009). Assim, em tumores de bexiga com origem endotelial, a sobre-expressão da p53 foi estatisticamente associada com hemangiosarcomas ($p<0.02$) apresentado invasão muscular (Carvalho *et al.*, 2009)

2.10.2. Ciclina D1

As Ciclinas do tipo D funcionam como factores de crescimento, que em conjunto com as quinases dependentes da Ciclina (CDK) CDK4 e CDK6 actuam na parte final da fase G1 do ciclo celular promovendo a passagem pelo ponto de controlo antes de entrar na fase S. Esta passagem dá-se através da fosforilação da proteína do retinoblastoma, contribuindo para a posterior replicação do genoma (Sherr, 2000). A expressão de Ciclina D1 está frequentemente aumentada em muitos tumores humanos devido à amplificação do gene *CCND1*, que a codifica, ou por rearranjos cromossómicos (Baffa *et al.*, 2006). É também proposto que a sobre-expressão observada seja causada indirectamente por outras alterações como a activação das vias da MAPK ou do PI3 (Knowles, 2006). As mutações na proteína β -catenina foram correlacionadas, em humanos, com a sobre-expressão não só do gene da Ciclina D1, mas também com o gene *c-myc*, com funções semelhantes às da Ciclina D1 (Shiina *et al.*, 2002).

Inicialmente, esta sobre-expressão tinha sido associada apenas com o crescimento de tumores papilíferos de baixo grau, sendo posteriormente considerada como um passo inicial no desenvolvimento tumoral e com o desenvolvimento de recidivas precoces em humanos (Lee *et al.*, 1997; Baffa *et al.*, 2006). Porém, outros autores não lhe conferem importância para o prognóstico (Shariat *et al.*, 2006). Estudos recentes reforçam a ideia de que a expressão de Ciclina D1 está inversamente correlacionada com o grau e estadio tumoral (Levidou *et al.*, 2010). Estes mesmos estudos relacionaram o aumento de expressão de Ciclina D1 em tumores superficiais, e a sua diminuição em tumores invadindo as camadas musculares, logo com pior prognóstico. Estes resultados reforçam a ideia de que os carcinomas do urotélio surgem a partir de duas vias, com diferenças moleculares subjacentes (Levidou *et al.*, 2010).

Em tumores vasculares da bexiga dos bovinos a expressão da Ciclina D1 foi correlacionada positivamente com o grau de malignidade (Carvalho *et al.*, 2009).

2.11. Proteínas estruturais

2.11.1. Uroplaquina III

As células superficiais do urotélio, “umbrella cells”, são caracterizadas pelas suas membranas citoplasmáticas altamente especializadas, as quais formam placas de aparência rígida na face luminal (Wu *et al.*, 1990). Estas mesmas placas apresentam um folheto luminal mais espesso que o folheto citoplasmático, e juntos formam a unidade assimétrica de membrana. Esta tem como função evitar a ruptura da bexiga, controlando a sua distensão, e actuar como uma barreira de permeabilidade (Staehelin *et al.*, 1972). Os principais constituintes da unidade assimétrica de membrana são as uroplaquinas (UPs). Estas proteínas em conjunto compõem uma família de 4 proteínas transmembranares, a UPIa (27 kDa), Ib (28 kDa), II (15kDa) e III (47 kDa). As UPs são produtos específicos da diferenciação do urotélio dos Mamíferos, tendo sido identificadas em várias espécies para além de bovinos, tais como o homem, o macaco, a ovelha, o porco, o cão, o coelho, o rato e o murganho. Estes dados comprovam que as UPs foram altamente conservadas durante evolução dos mamíferos (Wu *et al.*, 1994; Moll *et al.*, 1995). Estudos anteriores ao presente testaram anticorpos de coelho dirigidos contra a UPIII e a UPII em vários carcinomas humanos, e apenas nos carcinomas do urotélio se obteve uma marcação semelhante à das células normais do urotélio (Moll *et al.*, 1995). A utilização de anticorpos anti-UIII foi considerada como um meio vantajoso para a discriminação entre carcinomas primários do urotélio e outros carcinomas do tracto urogenital em humanos (Kaufmann, Volmerig & Dietel, 2000). Outros autores associaram a perda da expressão de UPIII com tumores de alto grau, e com um pior prognóstico em Medicina Humana (Ohtsuka, *et al.*, 2006).

No caso dos Animais Domésticos, estudos de expressão da UPIII foram já realizados em canídeos e em bovinos (Ambrosio *et al.*, 2001; Ramos-Vara *et al.*, 2003; Roperto *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009). Ao contrário do que se propõe para os humanos, dois destes estudos não encontraram qualquer relação entre o grau ou estadio tumorais e a marcação para UPIII em carcinomas do urotélio de caninos e bovinos, tendo sido identificada marcação em tumores de alto grau (Ramos-Vara *et al.*, 2003; Roperto *et al.*, 2005).

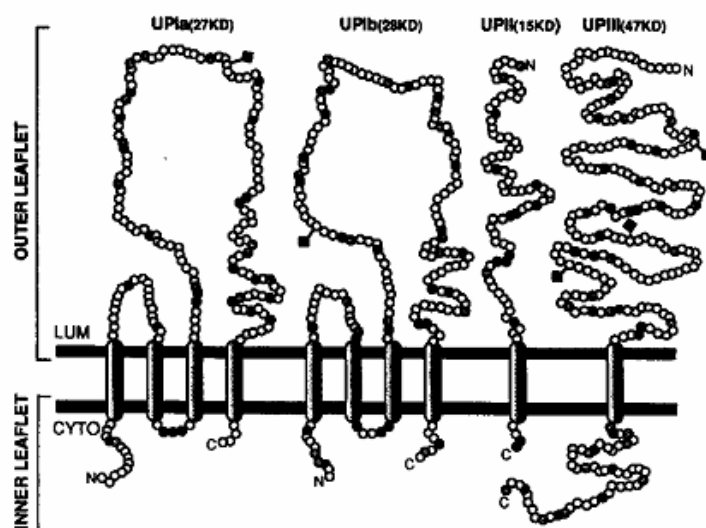


Figura 8 – Representação esquemática proposta da topologia trans-membranar das uroplaquinas bovinas (Fonte: Sun *et al.*, 1996)

2.11.2. Citoqueratina 7

Nas células eucarióticas o citoesqueleto é composto por três tipos de estruturas filamentosas morfologicamente diferentes: microfilamentos, filamentos intermédios e microtúbulos (Parry & Steinert, 1999). O citoesqueleto formado por estes sistemas de filamentos organizados em rede é responsável pela integridade mecânica da célula, e participa nos processos de divisão celular, motilidade e no contacto entre células. As citoqueratinas (CKs) pertencem à família dos filamentos intermédios, sendo constituídas por mais de 20 isotipos de proteínas do tipo I (CK9-CK20) e do tipo II (CK1-CK8). No urotélio podem ser identificadas diferentes citoqueratinas nas células dependendo das camadas em que as referidas células estão inseridas (Veranič & Jezernik, 2006). Nas células da camada basal identificam-se as citoqueratinas 5 e 17, nas camadas basal e intermédia a citoqueratina 13, e a citoqueratina 20 apenas na camada superficial. Por outro lado as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 são presumivelmente expressas em todas as camadas celulares do urotélio (Schaafsma *et al.*, 1989; Moll *et al.*, 1992; Guelstein *et al.*, 1993; Romih *et al.*, 1998; Southgate *et al.*, 1999).

Para além das alterações histológicas das células do urotélio, a mudança de expressão de citoqueratinas constitui um passo crucial na transformação neoplásica (Southgate *et al.*, 1999). Em Medicina Humana é, muitas vezes, necessário fazer a distinção entre carcinomas do urotélio e carcinomas com outras origens. Determinando simultaneamente o padrão de expressão da CK7 e CK20 é possível concluir qual a origem da neoplasia, pois estas são expressas de modos diferentes dependendo do carcinoma em causa (Banks, 1993; Harnden *et al.*, 1995; Bassily *et al.*, 2000). Ambas as citoqueratinas são expressas em muitos carcinomas

do urotélio, bem como em carcinomas pancreáticos, colangiocarcinomas e carcinomas mucinosos do ovário (Bassily *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2000). Por outro lado, a CK20 é um marcador de diferenciação das “umbrella cells”. A manutenção da expressão de CK20 no carcinoma do urotélio é considerada como um factor de bom prognóstico para o paciente (Harnden *et al.*, 1995).

A pesquisa da expressão de CK7 e CK20 foi estudada em 61 tumores do urotélio da bexiga de cães, dos quais 7 eram papilomas, e 54 carcinomas do epitélio de transição (Ramos-Vara *et al.*, 2003). A marcação positiva para CK7 foi detectada em 100% dos papilomas e em 98,1% dos carcinomas. Por sua vez, a marcação positiva para CK20 foi detectada apenas em 14,3% dos papilomas, em 68,5% dos carcinomas do epitélio de transição (Ramos-Vara *et al.*, 2003). Um estudo semelhante foi levado a cabo em vários carcinomas felinos e caninos. A expressão positiva de ambas as citoqueratinas CK7/CK20 foi encontrada em adenocarcinomas pancreáticos (100%), carcinomas do epitélio de transição (75%), e carcinomas do endométrio (67%), mas todos estes em felinos. Nenhum dos carcinomas caninos estudados apresentou expressão positiva simultânea para a CK7 e CK20 (Espinosa de los Monteros *et al.*, 1999).

3. OBJECTIVOS

Os objectivos do presente estudo são:

- (i) a pesquisa da expressão das proteínas estruturais UPIII e CK7 em carcinomas do urotélio da bexiga de bovinos afectados pela HEB, e a sua possível associação com os parâmetros de classificação, grau e estadio,
- (ii) a pesquisa da expressão alterada dos factores reguladores do ciclo celular Ciclina D1 e p53 nos mesmos carcinomas do urotélio, bem como a sua possível associação com o grau e estadio tumorais,
- (iii) a análise do possível valor dos tumores da bexiga de bovinos como modelos de estudo para os tumores de bexiga de outros animais e dos humanos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Colheita de amostras

Para o presente trabalho, foram colhidos tumores de bexiga a partir de 37 vacas da raça Holstein-Frísia abatidas no Matadouro Industrial da Ilha de São Miguel, Açores. Cerca de 90% dos animais apresentava hematúria, antes, ou após a chegada ao matadouro, e todos tinham passado largos períodos da sua vida, particularmente enquanto novilhas, em pastagens infestadas pelo feto comum. As suas idades variavam entre os 3 aos 12 anos, sendo a média de 6 anos.

Das bexigas em causa foram colhidos diversos tumores, frequentemente mais de um de cada órgão, os quais foram fixados em formol a 10% tamponado e processados para histopatologia de rotina, com inclusão em parafina. Os cortes de 3 micrómetros de espessura foram posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (H&E).

A identificação histológica dos tumores foi baseada nos critérios estabelecidos pela WHO (OMS) (Mostofi, Davis & Sesterhenn, 1999; Meuten *et al.*, 2004), e nas publicações recentes sobre lesões de bexiga relacionadas com Hematúria Enzoótica Bovina (Carvalho *et al.*, 2006). Da totalidade de tumores processados foram seleccionadas 56 neoplasias de origem vascular, cujo estudo deu origem a trabalho já publicado (Carvalho *et al.*, 2009). Das restantes neoplasias foram seleccionadas 39, todas de origem epitelial, 36 das quais foram colhidas de vacas diferentes, tendo as restantes três sido colhidas como neoplasias independentes a partir da bexiga de um único animal.

De modo a poder determinar-se se a imunoreactividade estava relacionada com o estadio/grau, os tumores foram classificados, seguindo a proposta da OMS para tumores de bexiga humana, de acordo com a sua invasão/estadio (pTa, tumor papilífero não invasivo; pT1, tumor sub-urotelial; pT2, tumor com invasão muscular; pT3, tumor com invasão do tecido adiposo adjacente à bexiga; pT4, tumor com invasão de estrutura/órgãos vizinhos à bexiga) e com o seu grau de malignidade (G1, bem diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pouco diferenciado; G4, indiferenciado).

Os tumores foram classificados por dois patologistas, e nos casos em que não houve acordo inicial, chegou-se a um consenso

4.2. Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica indirecta foi realizada recorrendo a “kits” comerciais contendo anticorpos marcados com peroxidase. A revelação foi feita com diaminobenzidina e peróxido de hidrogénio. A coloração de fundo foi feita com Hematoxilina de Mayer (ver Anexo II). Os anticorpos, métodos de recuperação antigénica, e sistemas de revelação utilizados estão mencionados na seguinte Tabela.

Tabela 3 – Anticorpos, métodos de recuperação antigénica e sistema de revelação utilizados

Antigénio	Clone/ Fonte	Recuperação	Tempo e Diluição	Sistema de Revelação/ Fonte
Uroplaquina III (UPIII)	PRO651108/clone AU1 <i>Research Diagnostics, Inc., Concord, MA</i>	proteínase K (<i>ready-to-use</i>) 10 minutos a temperatura ambiente	60 minutos (<i>ready-to-use</i>)	ImmPRESS/ <i>Vector Laboratories, Burlingame, CA</i>
Citoqueratina 7 (CK7)	18-0234, clone OV- TL12/30/ <i>Zymed Laboratories, San Francisco, CA</i>	tripsina pH 7,80 30 minutos a 37°C	60 minutos a 1:50	Histostain-plus/ <i>Zymed Laboratories, San Francisco, CA</i>
Ciclina D1	18-0220, clone AM29/ <i>Zymed Laboratories, San Francisco, CA</i>	microondas 20 minutos em EDTA pH 8	overnight a 1:100	ImmPRESS/ <i>Vector Laboratories,</i>
p53	MCA1701, clone DO1/Serotec, Inc.,	microondas 15 minutos em citrato, pH 6	overnight a 1:300	Histostain-plus/ <i>Zymed Laboratories, San Francisco, CA</i>

Devido a vários problemas técnicos, incluindo a destruição de cortes durante a recuperação antigénica para a detecção da Ciclina D1, não foi possível obter resultados fiáveis em 2 casos para a CK7, 4 casos para a Ciclina D1, 3 casos para a UPIII. No caso particular da identificação da proteína p53, os problemas que limitaram o uso da técnica a apenas 4 amostras estiveram relacionados com o anticorpo utilizado. De facto, lotes mais recentes do anticorpo indicado na Tabela 3 revelaram marcação sistematicamente negativa, independentemente da recuperação antigénica a que se recorreu. Adicionalmente, os resultados da aplicação de anticorpo policlonal foram descartados, dada a incapacidade de eliminar reacções inespecíficas, mesmo com recurso a várias técnicas de bloqueio.

Na validação dos anticorpos foi utilizado o urotélio normal limítrofe às neoplasias como controlo interno positivo para a CK7 e a UPIII. Um caso de linfoma humano foi incluído como controlo positivo para a marcação da Ciclina D1. O carcinoma ocular de células escamosas da 3ª pálpebra de bovino foi utilizado como controlo para a detecção de p53. O

valor limite de 5% (mais de 25 células tumorais marcadas em 500 células tumorais contadas aleatoriamente) foi aceite como marcação positiva para a CK7 e UPIII. O valor limite de 20% (mais de 100 células tumorais marcadas em 500 células tumorais contadas aleatoriamente) foi aceite como marcação positiva para a Ciclina D1 e p53. Os controlos negativos para a imuno-histoquímica foram processados de forma idêntica aos cortes para imuno-marcação, excepto o passo do anticorpo primário em que este foi substituído por tampão. Os detalhes da técnica de imuno-histoquímica são apresentados em anexo.

4.3. Análise estatística

A associação entre os marcadores moleculares e o grau (G0-G4) e estadio (Ta-T4) dos tumores epiteliais de bexiga estudados foi avaliada utilizando o Teste Exacto de Fisher. As análises estatísticas foram executadas utilizando o programa R-Stat Versão 2.12.1 para o Windows (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

5. RESULTADOS

5.1. Aspectos microscópicos

Os tumores do urotélio seleccionados foram classificados da seguinte forma: sete papilomas (figura 9) e trinta e dois carcinomas dos vários graus e estadios (ver Tabela 4) (figuras 9 a 14). Nenhum dos carcinomas foi classificado como T3 ou T4.

5.2. Imuno-histoquímica

Os resultados globais das reacções imuno-histoquímicas podem ser observados nas Tabelas 4 e 5.

5.2.1. UPIII

O padrão de marcação da UPIII foi muito intenso no pólo apical das células normais do urotélio. O mesmo padrão foi visto em todos os papilomas (figura 15). Nos carcinomas do urotélio as células neoplásicas geralmente exibiam marcação da membrana plasmática com ausência de polaridade clara (figura 16). Em alguns casos as células neoplásicas do urotélio apresentavam uma expressão da UPIII atípica, sendo esta difusa e por vezes granular (figura 18). Na maioria dos carcinomas do urotélio verificou-se marcação dispersa de UPIII, com áreas apresentando células fortemente positivas adjacentes a áreas não reactivas, constituídas por células neoplásicas pouco diferenciadas. A perda de marcação para UPIII foi vista em 46% (6/13) dos carcinomas de baixo grau (G1-G2) e em 81% (13/16) dos carcinomas de alto grau (G3-G4). Relativamente à invasão dos tecidos adjacentes, 85,7% (12/14) dos tumores não invasivos foram positivos para a marcação da UPIII. Por outro lado, 22,7% (5/22) carcinomas invasivos apresentaram marcação positiva. Na análise estatística a perda da expressão da UPIII foi associada tanto com o aumento do grau ($p<0.001$) como do estadio ($p<0.001$).

5.2.2. CK7

A expressão de CK7 nos papilomas foi semelhante à encontrada no urotélio normal, com as células positivas mostrando marcação citoplasmática difusa, presente desde a camada basal até à mais superficial (figura 15). O padrão de marcação nos carcinomas do urotélio foi

citoplasmático, com distribuição heterogénea dentro do tumor, marcando também estruturas glandulares. A intensidade de marcação foi maior do que a observada para a UPIII. A expressão de CK7 foi mantida em 73% (11/15) dos carcinomas de baixo grau (G1-G2) e em apenas 31% (5/16) dos carcinomas de alto grau (G3-G4). A expressão positiva para CK7 foi detectada em 92,9% (13/14) dos tumores não invasivos, diminuindo para 39,1% (9/23) nos tumores invasivos (figura 17). A expressão foi simultaneamente negativa para CK7 e UPIII em 56% (9/16) dos carcinomas de alto grau (G3-G4). Por outro lado, a expressão positiva para ambos os marcadores foi detectada em apenas um carcinoma de alto grau (1/16). Do mesmo modo que para a UPIII, a perda de expressão da CK7 foi estatisticamente associada com o aumento do grau ($p<0.001$) e do estadio ($p<0.001$).

5.2.3. Ciclina D1

A sobre-expressão da Ciclina D1 foi observada em 54% (7/13) dos carcinomas de baixo grau (G1-G2) e em 50% (8/16) dos carcinomas de alto grau (G3-G4) (figura 19). No total 46% (16/35) de todos os tumores testados demonstraram sobre-expressão da Ciclina D1. No caso dos tumores não invasivos a sobre expressão foi identificada em 41,7% (5/12), e em 47,8% (11/23) dos tumores invasivos. As diferenças de sobre-expressão de Ciclina D1 nos vários tumores analisados de diferentes graus e estadios não foram estatisticamente significativas no presente estudo.

5.2.4. P53

Apenas foi possível chegar resultados fiáveis em 4 casos pelas razões atrás expostas, nos quais se detectou sobre-expressão da p53 em 2 carcinomas de alto grau (G3-G4) com invasão muscular (T2) (figura 20). Devido ao baixo número de carcinomas em que foi possível determinar imuno-marcação pela p53 não foi efectuada a análise estatística relativa a este parâmetro.

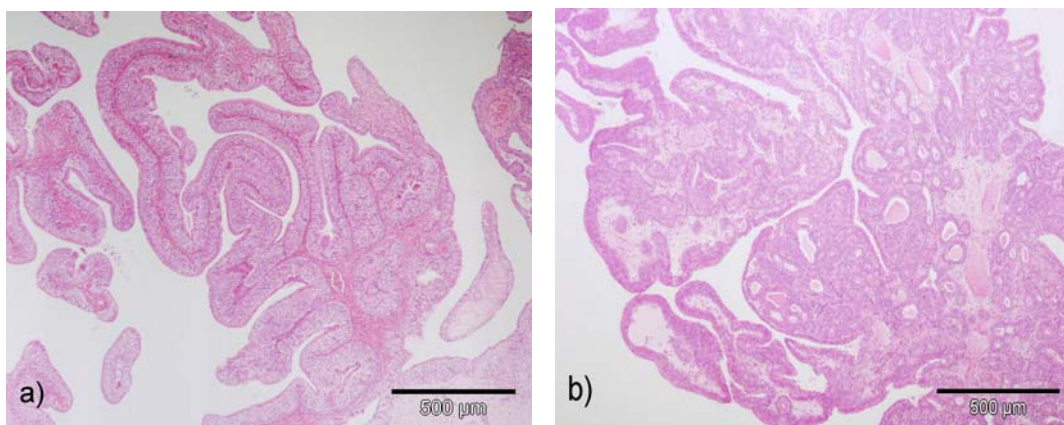


Figura 9 – Diferentes tipos de tumores epiteliais da bexiga de bovino. a) Papiloma do urotélio com delicado estroma fibro-vascular (H & E). b) Carcinoma exofítico não invasivo do urotélio TaG1 (H&E).

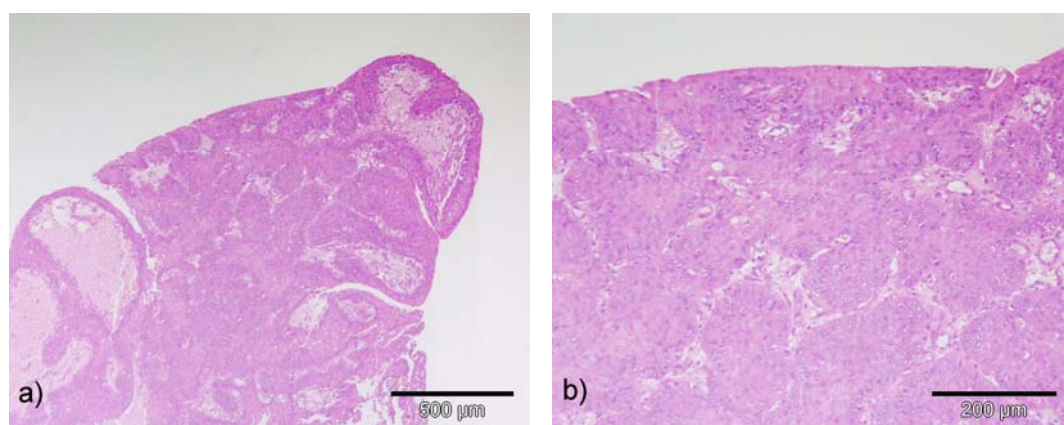


Figura 10 – Carcinoma do urotélio da bexiga de bovino T1G1. a) O carcinoma ultrapassa a membrana basal, invadindo o estroma formando placas de células neoplásicas (H&E). b) Pormenor de a) (H&E).

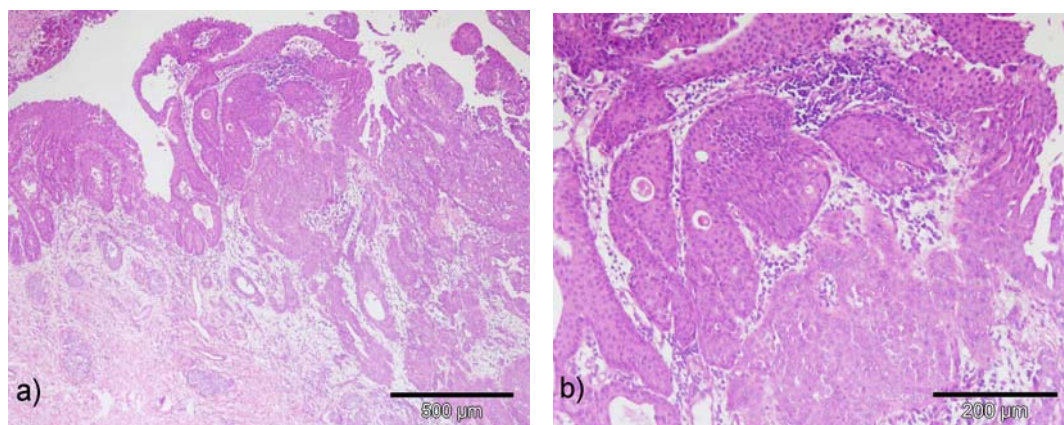


Figura 11 – Carcinoma invasivo do urotélio da bexiga de bovino T1G2. a) O carcinoma invade a lâmina própria formando agregados, sob a forma de cordões de células neoplásicas moderadamente diferenciadas (H&E). b) Pormenor de a) (H&E).

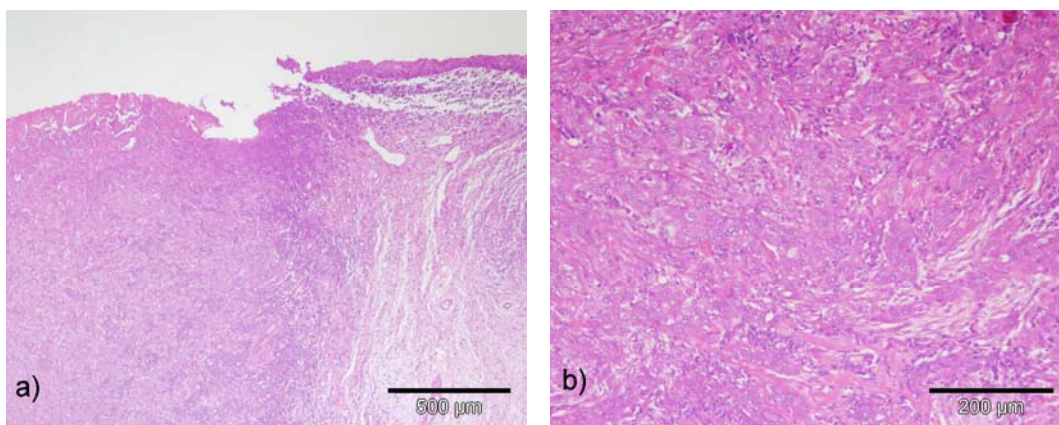


Figura 12 – Carcinoma invasivo do urotélio da bexiga de bovino T1G3. a) Carcinoma não papilar invadindo em profundidade a lâmina própria, com destruição do urotélio normal (H&E). b) Pormenor de a), exibindo ausência de organização das células neoplásicas pouco diferenciadas (H&E).

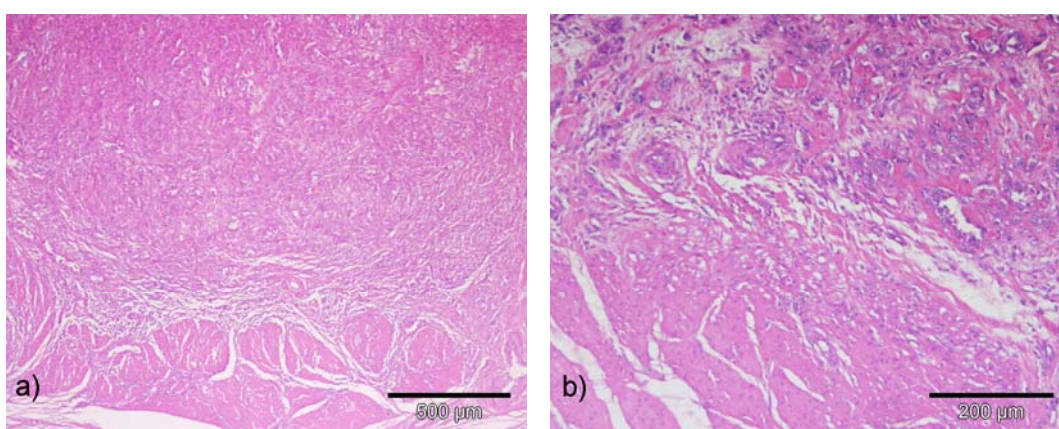


Figura 13 – Carcinoma do urotélio com invasão muscular T2G3. a) O carcinoma penetra na profundidade da parede da bexiga até à camada muscular (H&E). b) Pormenor de a) mostrando as células neoplásicas pouco diferenciadas que invadem os feixes de fibras musculares (H&E).

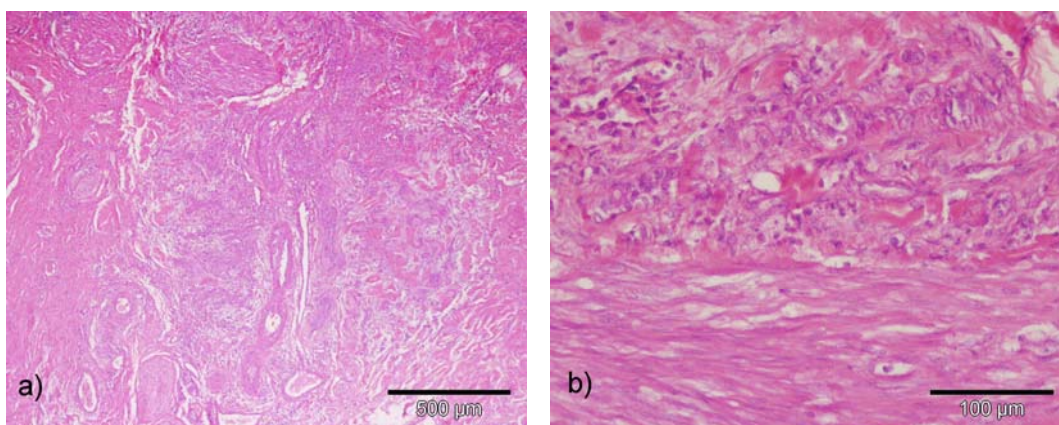


Figura 14 – Carcinomas do urotélio com invasão muscular da bexiga de bovino T2G4. a) As células neoplásicas invadem a camada muscular, destruindo os feixes musculares (H&E). b) Pormenor de a) mostrando fibras musculares destruídas pelas células neoplásicas indiferenciadas (H&E).

Tabela 4 – Classificação histológica e caracterização imuno-histoquímica dos carcinomas do urotélio da bexiga de bovinos

#	Classificação	UPIII	CK7	Ciclina D1	p53
1	papiloma	+	+	-	nd
2	papiloma	+	nd	nd	nd
3	papiloma	+	+	-	nd
4	papiloma	+	+	-	nd
5	papiloma	+	+	-	nd
6	papiloma	+	+	-	nd
7	papiloma	+	+	+	nd
8	TaG1	nd	+	-	nd
9	TaG1	nd	+	nd	nd
10	TaG1	-	nd	-	nd
11	TaG1	-	-	nd	nd
12	TaG1	+	+	+	-
13	TaG1	+	+	nd	-
14	TaG1	+	+	+	nd
15	TaG1	+	+	+	nd
16	TaG1	+ *	+	+	nd
17	T1G1	+	-	-	nd
18	T1G2	-	+	-	nd
19	T1G2	-	-	-	nd
20	T1G3	-	-	+	nd
21	T1G3	+ *	-	+	nd
22	T1G3	+ *	-	-	nd
23	T1G3	-	-	-	nd
24	T1G3	-	-	-	nd
25	T1G3	-	-	-	nd
26	T2G2	-	+	+	nd
27	T2G2	+ *	+	+	nd
28	T2G2	-	+	-	nd
29	T2G2	nd	-	+	nd
30	T2G3	-	-	-	nd
31	T2G3	-	-	-	nd
32	T2G3	-	-	+	nd
33	T2G3	-	+	+	+
34	T2G3	-	+	+	nd
35	T2G3	-	+	+	nd
36	T2G4	+	+	+	nd
37	T2G4	-	-	+	+
38	T2G4	-	+	-	nd
39	T2G4	-	-	-	nd

Classificação, estadió: pTa, tumor não invasivo; pT1, o tumor invade o tecido sub-urotelial; pT2, o tumor invade o músculo; grau: G1, carcinoma bem diferenciado; G2, carcinoma moderadamente diferenciado; G3, carcinoma pouco diferenciado; G4, carcinoma indiferenciado; nd, não determinado; +, positivo; -, negativo, +*, marcação focal atípica.

Tabela 5 – Imunorreactividade da UPIII, CK7 e Ciclina D1 em relação ao grau e estadio dos carcinomas do urotélio da bexiga de bovinos

Parâmetros	UPIII positiva <i>n</i> / total (%)	Valor de <i>P</i>	CK7 positiva <i>n</i> / total (%)	Valor de <i>P</i>	Ciclina D1 positiva <i>n</i> / total (%)	Valor de <i>P</i>
<i>Grau</i>						
G0	7/7 (100%)	<i>p</i> <0.001	6/6 (100%)	<i>p</i> <0.001	1/6 (16,7%)	Ns
G1	6/8 (75%)		7/9 (77,8%)		4/7 (57,1%)	
G2	1/5 (20%)		4/6 (66,7%)		3/6 (50%)	
G3	2/12 (16.7%)		3/12 (25%)		6/12 (50%)	
G4	1/4 (25%)		2/4 (50%)		2/4 (50%)	
<i>Estadio</i>						
Não invasivo/pTa	12/14 (85,7%)	<i>p</i> <0.001	13/14 (92,9%)	<i>p</i> <0.001	5/12 (41,7%)	Ns
Sub-urotelial/pT1	3/9 (33,3%)		1/9 (11,1%)		2/9 (22,2%)	
Invasão muscular/pT2	2/13 (15,4%)		8/14 (57,1%)		9/14 (64,3%)	

Classificação, estadio: pTa, tumor não invasivo; pT1, o tumor invade o tecido sub-urotelial; pT2, o tumor invade o músculo; grau: G1, carcinoma bem diferenciado; G2, carcinoma moderadamente diferenciado; G3, carcinoma pouco diferenciado; G4, carcinoma indiferenciado; Valor de *p* calculado pelo Teste Exacto de Fisher; Ns, sem significância estatística.

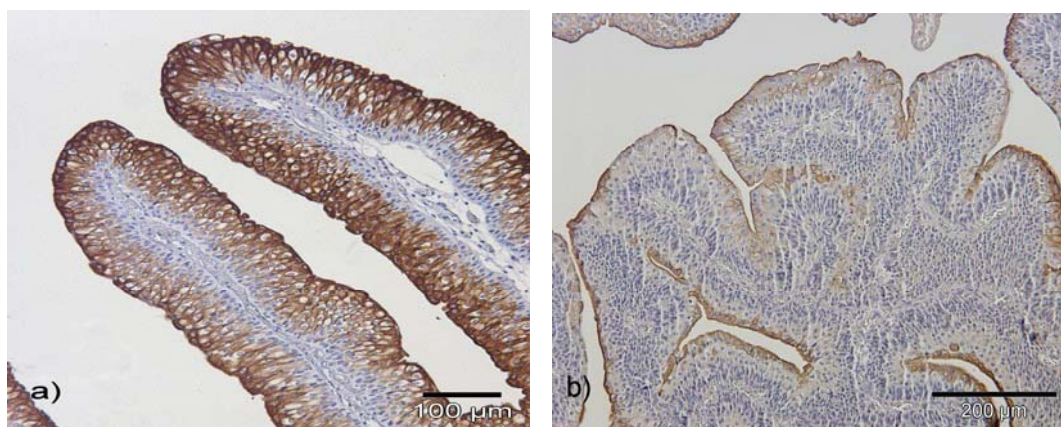


Figura 15 – Papiloma do urotélio da bexiga de bovino. a) Marcação citoplasmática intensa para CK7. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. b) Marcação para UPIII no pólo apical das células uroteliais mais superficiais. ImmPRESS-peroxidase e Hematoxilina de Mayer.

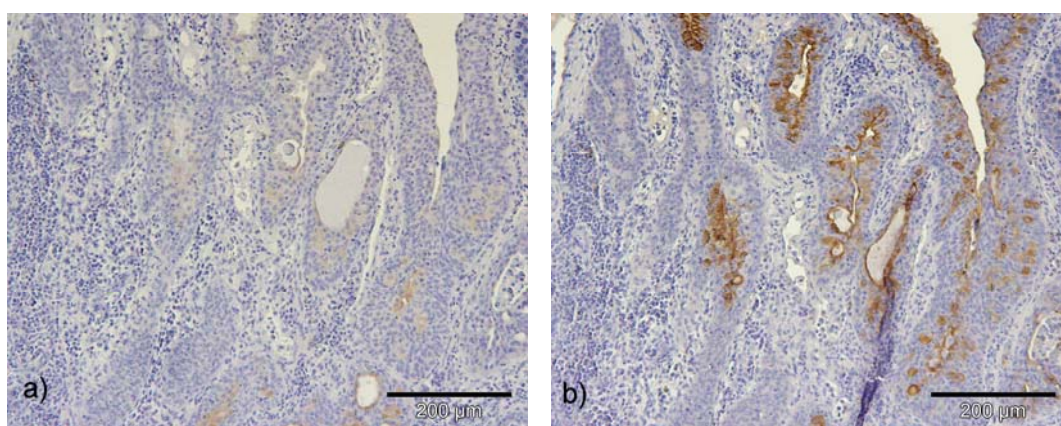


Figura 16 – Carcinoma do urotélio da bexiga de bovino T1G3. a) Marcação de fraca intensidade para CK7 das células uroteliais neoplásicas. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. b) Marcação heterogênea para UPIII nas células neoplásicas do mesmo campo. ImmPRESS-peroxidase e Hematoxilina de Mayer.

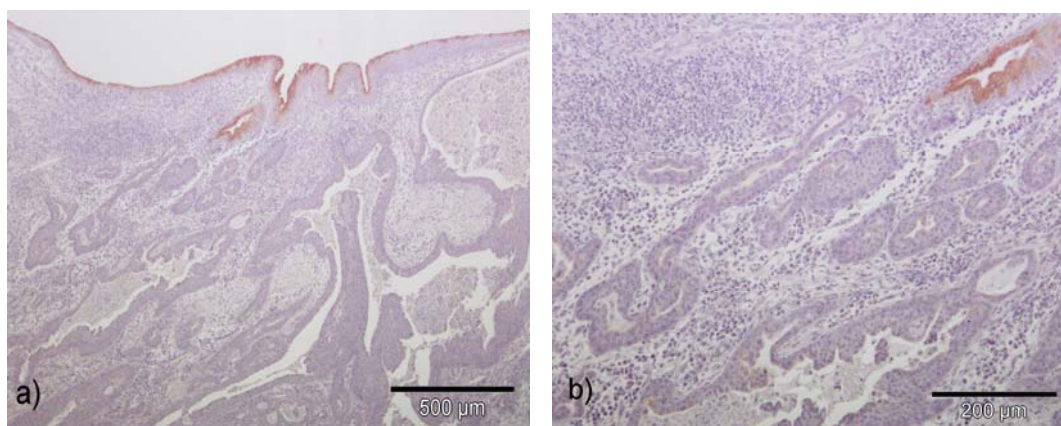


Figura 17 – Carcinoma do urotélio de bexiga de bovino T2G2. a) Ausência de marcação para CK7 nas células neoplásicas, mantendo-se a marcação nas células normais na superfície do órgão. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. b) Maior ampliação da mesma neoplasia, mostrando um campo semelhante. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer.

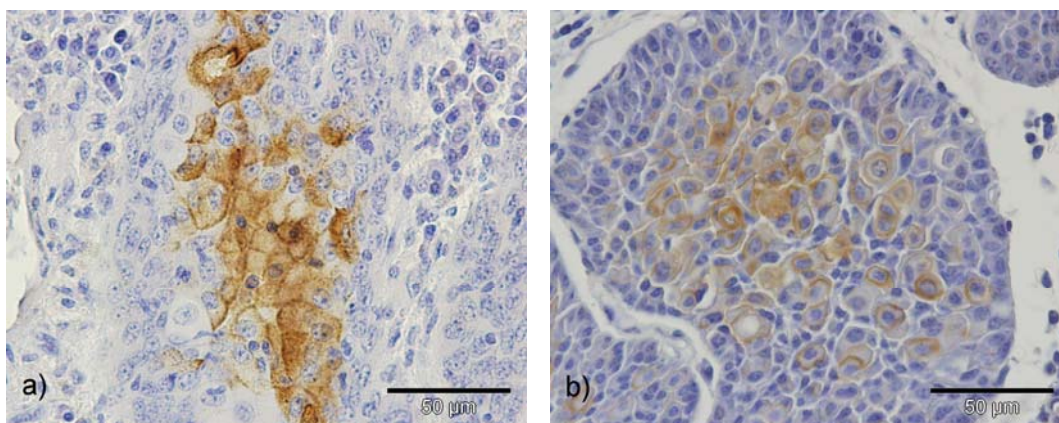


Figura 18 – a) e b) Expressão atípica da UPIII em carcinomas do urotélio T1G3. Marcação difusa, por vezes granular, com ausência de polaridade. ImmPRESS-peroxidase e Hematoxilina de Mayer.

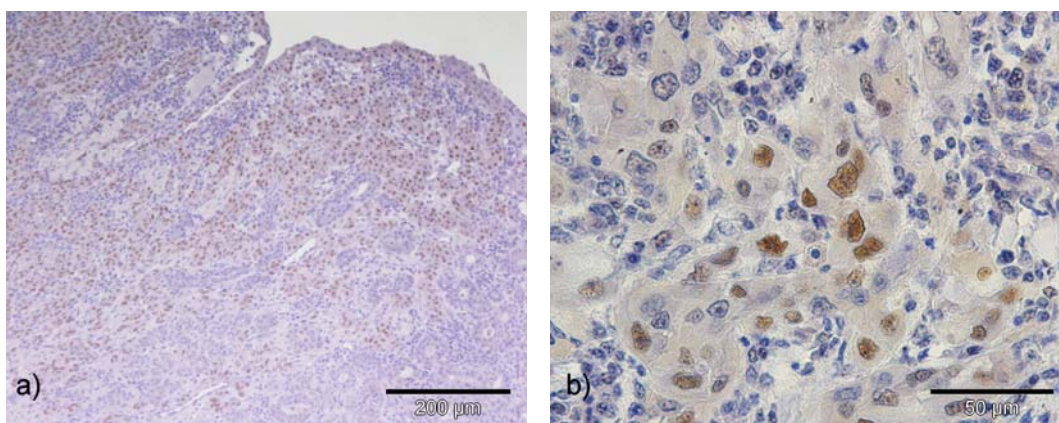


Figura 19 – Carcinoma do urotélio da bexiga de bovino T2G3. a) Forte marcação nuclear para Ciclina D1 numa grande percentagem das células neoplásicas. ImmPRESS-peroxidase e Hematoxilina de Mayer. b) Pormenor da marcação nuclear para Ciclina D1. ImmPRESS-peroxidase e Hematoxilina de Mayer.

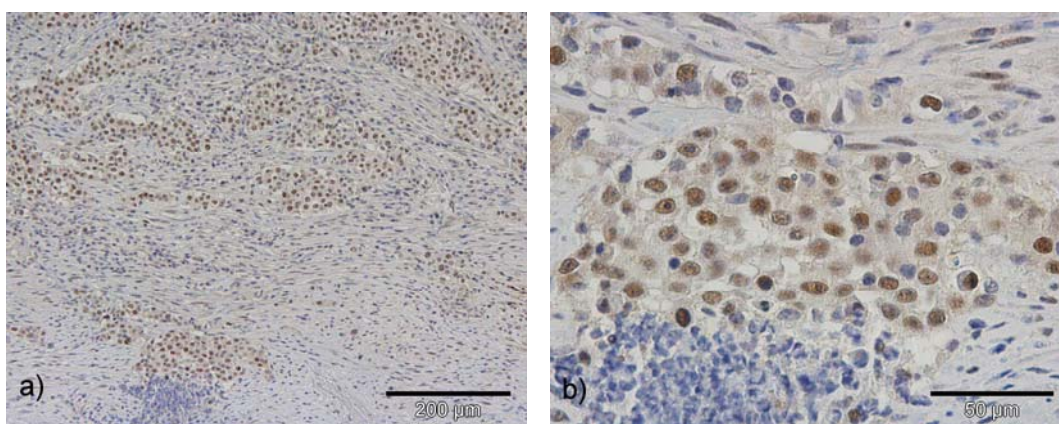


Figura 20 – Carcinoma do urotélio da bexiga de bovino T2G4. a) Marcação nuclear da maioria das células neoplásicas para p53 num carcinoma do urotélio invadindo o músculo. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. b) Pormenor da marcação nuclear para p53. Histostain-plus e Hematoxilina de Mayer. (Fotos cedidas por Tânia Carvalho).

6. DISCUSSÃO

As condições edafo-climáticas que se encontram no Arquipélago dos Açores favorecem fortemente a presença e a persistência do feto comum (Pinto, 2010). Estudos efectuados na Ilha de São Miguel identificaram infestação por *Pteridium aquilinum* em 312 das 365 parcelas observadas (88,4%), quase exclusivamente junto às barreiras separadoras entre pastagens (Pinto, 2010). O corte do feto comum realizado pelos bovinicultores, método ainda utilizado para o controlo da infestante na Ilha de São Miguel, leva ao crescimento de rebentos jovens e tenros da planta, favorecendo a ingestão da mesma o que exacerba os seus efeitos tóxicos devido à ingestão de níveis elevados Pta e outras toxinas, presentes em maiores concentrações nas plantas jovens (Pinto, 2010). As zonas mais afectadas pela HEB são as de orografia mais irregular, com pastagens difíceis de lavrar, onde pastoreiam predominantemente os bovinos mais jovens (Pinto, 2010), sendo que as pastagens de baixa altitude (<200m), com terrenos pobres e de baixa pluviosidade no Verão são das mais contaminadas. Nestas, o feto comum está presente ao longo de todo o ano devido às temperaturas mais elevadas do ar e à menor humidade do solo comparativamente com as pastagens de maior altitude (Pinto, 2010).

Foi possível constatar que, entre 2000 e 2009, no Matadouro Industrial de São Miguel, o grupo mais afectado pela HEB foi o das “fêmeas paridas com mais de 2 anos”, o qual era constituído, quase na sua totalidade, por vacas leiteiras no fim da vida produtiva (Pinto, 2010). Esta observação deve-se à maior longevidade destes animais, logo, ao maior período de tempo em que foram expostos ao ptaquilósido através do consumo continuado de feto comum (Pinto, 2010). Experimentalmente foi demonstrado que são necessários pelo menos 500 dias de exposição às toxinas do feto para se desenvolverem tumores de bexiga em bovinos (Pamukcu *et al.*, 1976).

Em 1987, foi provado inequivocamente o efeito carcinogénico do ptaquilósido (Hirono *et al.*, 1987). A ligação covalente entre o Pta e o ADN foi comprovada como o mecanismo de carcinogénese por outros autores (Kushida *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1994; Prakash *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 2007). Os valores médios de ptaquilósido obtidos por Pinto a partir de 50 amostras de feto comum colhidas em pastagens da Ilha de São Miguel foram superiores a $2500 \mu\text{g g}^{-1}$ MS nas frondes tenras e nos rebentos da planta, considerando-se que níveis acima de $500 \mu\text{g g}^{-1}$ MS já são elevados (Pinto, 2010). Estudos citogenéticos foram efectuados em bovinos com HEB, revelando que existia um maior número de anomalias cromossómicas em linfócitos do sangue periférico, comparativamente com animais sem acesso ao feto comum (Lioi *et al.*, 2004). Estes autores observaram ainda que os efeitos

clastogénicos eram mais frequentes nos bovinos em que os tumores de bexiga estavam associados com a infecção por BPV-2 (Lioi *et al.*, 2004).

Em 1992, Campo e seus colegas demonstraram uma forte relação entre o BPV-2 e o consumo do feto comum na génese de tumores de bexiga, tanto naturalmente como experimentalmente. Posteriormente, vários estudos detectaram ADN do BPV-1 e 2 em bexigas apresentando neoplasias, bem como em bexigas aparentemente normais (Borzacchiello *et al.*, 2003; Wosiacki *et al.*, 2005; Benevides *et al.*, 2006; Balcos *et al.*, 2008; Pinto, 2010; Resendes *et al.*, 2010).

Foi sugerido que compostos carcinogénicos e imunossupressores do feto comum actuariam em conjunto com as proteínas virais, activando o vírus latente e iniciando o processo neoplásico (Campo, 1997). A oncoproteína E5 do BPV possui a capacidade de induzir a transformação celular, tendo sido detectada em tumores de bexiga de bovinos por métodos de imuno-histoquímica, nos quais também se detectou ADN do BPV-2 através de métodos de PCR (Borzacchiello *et al.*, 2003). O mesmo efeito oncogénico foi observado em culturas celulares de fibroblastos de roedores e queratinócitos (Leptak *et al.*, 1991; Petit *et al.*, 1991; citados por Borzacchiello *et al.*, 2006). Novos dados vieram apoiar a hipótese do papel oncogénico da E5 no caso dos tumores da bexiga, através da formação de um complexo estável entre a E5 e o receptor β do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF-R β) (Borzacchiello *et al.*, 2006).

O modelo animal de infecção por papilomavirus é de grande valor na pesquisa e desenvolvimento de vacinas anti-virais humanas. As vacinas que utilizam os mesmos genes ou proteínas virais podem funcionar tanto profilaticamente, protegendo contra a infecção ou doença, ou terapêuticamente, induzindo a regressão de lesões precoces (Campo, 2002). Segundo alguns autores a vacinação com E5 em bovinos afectados pela HEB poderia ser um modelo ideal para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas para doenças semelhantes no Homem (Borzacchiello *et al.*, 2006). Para além disso, a identificação e compreensão dos factores causadores e dos mecanismos moleculares envolvidos na génese dos tumores de bexiga em bovinos poderá providenciar importantes contributos para a prevenção e controlo do cancro tanto em Medicina Humana como Veterinária (Roperto *et al.*, 2009).

A presente tese teve como objectivo avaliar a expressão das proteínas estruturais UPIII e CK7, e ainda das proteínas reguladoras do ciclo celular Ciclina D1 e p53, em tumores epiteliais de bexiga de bovinos associados aos efeitos carcinogénicos do feto comum. As alterações do padrão de marcação da UPIII foram já descritas em outros estudos de tumores de animais, demonstrando que as uroplaquinas são redistribuídas pela célula durante o

processo de transformação neoplásica (Ambrosio *et al.*, 2001; Ramos-Vara *et al.*, 2003; Roperto *et al.*, 2005). O padrão de marcação da UPIII observado nos papilomas foi muito intenso no pólo apical das células, idêntico ao das células normais do urotélio. A perda de marcação para UPIII foi observada em tumores de alto grau e em tumores invasivos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos de carcinomas do urotélio do tracto urinário superior em humanos, observando-se a perda de expressão de UPIII em tumores de alto grau e estadio avançado, considerando este dado um indicador importante de prognóstico (Ohtsuka *et al.*, 2006). Mais recentemente, a perda de expressão de UPIII foi igualmente associada com características agressivas dos tumores de bexiga em humanos, como o estadio avançado e o alto grau (Matsumoto *et al.*, 2008). Porém, nas pesquisas em animais não foi encontrada relação entre a detecção de UPIII e o grau dos carcinomas do urotélio em cães (Ramos-Vara *et al.*, 2003), concluindo alguns autores que as uroplaquinas possuem um limitado valor de prognóstico no caso dos bovinos (Ambrosio *et al.*, 2001; Roperto *et al.*, 2005). Em 2007, Carvalho referiu a associação entre a perda de expressão da UPIII com o aumento do estadio ($p<0.04$) e o grau ($p=0.001$) em carcinomas do urotélio da bexiga de bovinos. Os resultados do presente estudo sugerem existir igualmente uma associação entre a perda de positividade para a UPIII e o aumento do grau/invasão ($p<0.001$) dos carcinomas do urotélio em bovinos, semelhante ao que se constata nos humanos, demonstrando perda da diferenciação celular.

A CK7 foi detectada através de métodos de imuno-histoquímica em 82 a 100% dos casos de carcinomas do urotélio em humanos (Bassily *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2000; Moll *et al.*, 1988). Apesar da expressão das citoqueratinas estar limitada aos epitélios e aos seus tumores, estas não constituem marcadores tumorais específicos (Chu *et al.*, 2000). A expressão destas citoqueratinas é amplamente conservada durante a transformação celular e o desenvolvimento tumoral (Hynes *et al.*, 1978; Sun *et al.*, 1979, citados por Chu *et al.*, 2000). A expressão de CK7 nos papilomas foi semelhante à encontrada no urotélio normal, sendo uma marcação citoplasmática difusa, desde a camada basal até à mais superficial. A marcação de CK7 observada nos carcinomas do urotélio dos bovinos estudados diminuiu nos carcinomas de grau mais alto ($p<0.001$), bem como nos carcinomas invasivos ($p<0.001$). Bassily *et al.*, em 2000, não identificaram alterações significativas da expressão de CK7 e 20 nos carcinomas de vários graus em humanos. Noutro estudo ainda em humanos, a maioria dos carcinomas do epitélio de transição (21/24) exprimiam CK7 (Chu *et al.*, 2000). O padrão de distribuição desta citoqueratina em carcinomas felinos e caninos é muito semelhante à descrita em humanos, embora exista alguma diferença entre os tumores animais (Espinosa de los

Monteros *et al.*, 1999). A marcação heterogênea por soro anti-CK 7 foi relatada em carcinomas do urotélio de cães, havendo ausência de marcação em células fenotipicamente semelhantes no mesmo corte histológico (Ramos-Vara *et al.*, 2003). O mesmo autor aponta o tempo prolongado de fixação das amostras como causador da diminuição da intensidade de marcação por CK 7, sendo esta diminuição ligeira após uma semana de fixação, e mais significativa após 28 dias de fixação (Ramos-Vara *et al.*, 2003). O tempo de fixação prolongado de algumas amostras utilizadas neste estudo pode estar na origem da diminuição da marcação pelo anticorpo anti-CK 7, não tendo sido constatada diferença entre a intensidade de marcação do urotélio normal e dos papilomas.

A sobre-expressão de Ciclina D1 foi observada em 46% (16/35) de todos os tumores testados, 54% (7/13) dos carcinomas de baixo grau (G1-G2), e em 50% (8/16) dos carcinomas de alto grau (G3-G4). Em relação à invasão dos tecidos subjacentes, 42% (5/12) dos tumores não invasivos demonstravam sobre-expressão de Ciclina D1, sendo que apenas um dos seis papilomas testados era positivo. Esta sobre-expressão foi identificada em 48% (11/23) dos tumores invasivos. Vários autores relacionam a sobre-expressão de Ciclina D1 com tumores superficiais do urotélio em humanos (Lee *et al.*, 1997; Baffa *et al.*, 2006; Levidou *et al.*, 2010). Acrescentam ainda o possível papel da Ciclina D1 na progressão do tumor, assumindo este um comportamento mais agressivo quando a sobre-expressão é manifesta (Baffa *et al.*, 2006; Levidou *et al.*, 2010). Porém, em outros estudos, não foi possível associar a sobre-expressão da Ciclina D1 com qualquer tipo de características patológicas (Shariat *et al.*, 2006; Shariat *et al.*, 2007). Estudos de tumores vasculares da bexiga de bovinos relacionaram positivamente a sobre-expressão de Ciclina D1 com o grau de malignidade (Carvalho *et al.*, 2008). Aparentemente não existe associação entre o grau/invasão e a sobre-expressão de Ciclina D1 em carcinomas do urotélio nos bovinos estudados, ao contrário do que foi descrito para tumores vasculares. Carvalho, em 2007, obteve resultados semelhantes, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre a sobre-expressão da Ciclina D1 e o grau ou estadio dos carcinomas do urotélio de bovinos estudados por esta autora.

A via de sinalização da p53 assume um papel importante na resposta a estímulos como lesões no ADN, stress oncogénico, e outros tipos de stress celular (Luis *et al.*, 2007). Em resposta às lesões no ADN a p53 induz a expressão da p21, a qual inibe os complexos Ciclina/CDK, evitando a fosforilação das proteínas pRb (Cordon-Cardo, 1995). As mutações no gene *TP53* e a sobre-expressão nuclear da p53 são pouco comuns em tumores TaG1/G2, sendo muito frequentes em tumores de alto grau e invasivos (Kelsey *et al.*, 2004). As alterações ou

perturbações na via de sinalização da p53 foram identificadas como das mais importantes para o desenvolvimento de um comportamento agressivo do tumor (Goebell *et al.*, 2010). A acumulação da p53 constitui um factor de prognóstico, estando relacionada com a progressão da doença, e com menores taxas de sobrevivência em humanos (Esrig *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2009). Num estudo conduzido em carcinomas do urotélio de bexiga de bovinos, apenas o estadio foi associado com a sobre-expressão da p53 ($p < 0.03$), não havendo diferenças estatisticamente significativas em relação ao grau (Carvalho, 2007).

Os resultados da expressão da p53 no presente trabalho estão reduzidos a apenas quatro casos devido a problemas técnicos, não tendo sido observados resultados fiáveis nos restantes. A diferença de marcação entre lotes diferentes de anticorpo anti-p53 mono clonal DO-1 levou à alteração do protocolo de imuno-histoquímica, recorrendo-se a novos sistemas de detecção, recuperação antigénica e novas diluições do anticorpo primário, obtendo-se sempre resultados pouco fiáveis. A utilização do anticorpo anti-p53 policlonal CM-1 por sua vez conduziu a grandes problemas de marcação citoplasmática inespecífica, dificultando a observação da expressão nuclear. A escassez de casuística limitou neste caso a possibilidade de propor associações estatisticamente válidas.

7. CONCLUSÃO

Após este estudo, pode concluir-se que a utilização da marcação da proteína estrutural UPIII possui um grande valor na avaliação de carcinomas do urotélio imuno-histoquímica. A sua expressão foi encontrada predominantemente em carcinomas de baixo grau e menos invasivos, tendo sido comprovada a sua associação estatística com estes parâmetros.

A expressão da CK7 foi mantida em alguns dos carcinomas do urotélio de alto grau e em tumores que invadiam o músculo. Este facto torna útil a sua pesquisa associada à utilização da UPIII nos casos de carcinomas pouco diferenciados ou até indiferenciados, de modo a confirmar a sua origem no urotélio, já que a expressão da UPIII é perdida nos carcinomas de alto grau e mais invasivos.

A sobre-expressão da Ciclina D1 tanto em tumores não invasivos como nos invasivos demonstra que esta realmente participa no processo tumoral da bexiga nos animais afectados pela HEB. Os dados estatísticos não permitem fazer associações com nenhum dos parâmetros de classificação dos carcinomas do urotélio.

Os problemas técnicos impediram o desenvolvimento do estudo pretendido relacionado com a sobre-expressão da p53 nos tumores seleccionados. É necessário continuar a pesquisar novos protocolos para a detecção da p53 por imuno-histoquímica de modo a completar os estudos, podendo chegar-se a conclusões envolvendo alterações a nível molecular no desenvolvimento e progressão tumorais nos carcinomas do urotélio da bexiga de bovinos com HEB.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrosio, V., Borzacchiello, G., Bruno, F., Galati, P., and Roperto, F. (2001). Uroplakin expression in the urothelial tumors of cows. *Vet Pathol*, **38**, 657-660.
- Baffa, R., Letko, J., McClung, C., LeNoir, J., Vecchione, A., and Gomella, L. G. (2006). Molecular genetics of bladder cancer: targets for diagnosis and therapy. *J Exp Clin Cancer Res*, **25**, 145-160.
- Balcos, L. G., G. Borzacchiello, et al.,. (2008). Association of bovine papillomavirus type-2 and urinary bladder tumours in cattle from Romania. *Res Vet Sci*, **85**, 145-148.
- Banks, W. J. (1993). Epithelia. In: *Applied Veterinary Histology*, 3rd ed., pp 48- 67, Mosby Year Book, St. Louis, MO .
- Bassily, N. H., Vallorosi, C. J., Akdas, G., Montie, J. E., Rubin, M. A. (2000). Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in prostate adenocarcinoma and bladder urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol*, **113**, 383-388.
- Benevides, S., Medeiros, A., Garret, F., Bernardo, S., Pinto, C. A., (2006). Preliminary studies on the etiological role of bovine papillomavirus on chronic enzootic haematuria. *Proceedings of the International Symposium Intractable Weeds and Plant Invaders*, Ponta Delgada, Azores: 38
- Borzacchiello, G., Ambrosio V., et al.,. (2003). Cyclooxygenase-1 and -2 expression in urothelial carcinomas of the urinary bladder in cows. *Vet Pathol*, **40**, 455-9.
- Borzacchiello, G., Russo V., et al.,. (2006). Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor [beta] receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. *Oncogene*, **25**, 1251-1260.
- Borzacchiello, G. and Roperto, F. (2008). Bovine papillomaviruses, papilomas and cancer in cattle. *Vet Res*, **39**, 39- 45.
- Borzacchiello, G., Resendes A. R., et al.,. (2009). Co-expression of bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring carcinomas of the urinary bladder in cattle. *J Comp Pathol*, **141**, 84-88.
- Brennan, P., Bogillot, O. et al.,. (2000). Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*, **86**, 289-294.
- Brennan, P., Bogillot, O. et al.,. (2001). The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data). *Cancer CausesControl*, **12**, 411-417.
- Bringuier, P. P. e Jean-Blainc, C. (1987). Hématurie Chronique des Bovines: Étiologie et Épidemiologie. *Le Point Veterinaire*, **19**, 393-403.
- Budman, L. I., Kassouf, W., Steinberg, J. R. (2008). Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J*, **2**, 212-221.

- Campo, M. S., Jarrett, W. F. et al., (1992). Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res*, **52**, 6898-6904.
- Campo, M. S. (1997). Bovine papillomavirus and cancer. *Vet J*, **154**, 175-188.
- Campo, M. S. (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res*, **89**, 249-261.
- Carvalho, T., Vala, H., Pinto, C. A., Pinho, M., Peleteiro, M. C. (2005) Immunohistochemical studies of epithelial cell proliferation and p53 mutation in bovine ocular squamous cell carcinoma. *Vet Pathol*, **42**, 66-73.
- Carvalho, T.; Pinto, C. A. e Peleteiro, M. C. (2006). Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. *J. Comp. Pathol.*, **134**: 336-346
- Carvalho, T. (2007). Morphological and Phenotypical Characterization of Urinary Bladder Lesions in Bovine Enzootic Haematuria. Dissertação de Doutorado em Sanidade Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Carvalho, T., Naydan, D., Nunes, T., Pinto, C. A., Peleteiro, M. C. (2009). Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic hematuria. *Vet Pathol*, **46**, 211-221.
- Castillo-Martin, M., Domingo-Domenech, J., Karni-Schmidt, O., Matos, T. Cordon-Cardo, C. (2010). Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol*, **28**, 401-408.
- Chatterjee, S. J., Datar, R., Youssefzadeh, D., George, B., Goebell, P. J., Stein, J. P., Young, L., Shi, S. R., Gee, C., Groshen, S., Skinner, D. G., Cote, R. J. (2004). Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol*, **22**, 1007-1013.
- Chu, P., Wu, E., Weiss, L. M. (2000). Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol*, **13**, 962-972.
- Claus, M. P., M. Lunardi, et al., (2008). Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. *Vet Microbiol*, **132**, 396-401
- Cordon-Cardo, C. (1995). Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol*, **147**, 545-560.
- Crallan, R. A., Georgopoulos, N. T et al., (2006). Experimental models of human bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **27**, 374-381.
- Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., Bouck, N. (1994). The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **59**, 483-489.
- Dawra R. K. and Sharma O. P. (2001). Enzootic bovine haematuria – past, present and future. *Veterinary Bulletin* **71**, R1-R27.

- DiMaio, D., C. C. Lai, and Mattoon, D. (2000). The platelet-derived growth factor beta receptor as a target of the bovine papillomavirus E5 protein. *Cytokine Growth Factor Rev*, **11**, 283-293.
- DiMaio, D. and D. Mattoon (2001). Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*, **20**, 7866-7873.
- Eble, J. N., Sauter, G., Epstein, J. I. and Sesterhenn, I. A., Eds (2004). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. *IARC Press*, Lyon, France.
- Espinosa de los Monteros, A., Fernandez, A., Millán, M. Y., Rodríguez, F., Herráez, P., Martín de las Mulas, J. (1999). Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in feline and canine carcinomas. *Vet Pathol*, **36**, 179- 190.
- Esrig, D., Spruck, C. H. 3rd, Nichols, P. W., Chaiwun, B., Steven, K., Groshen, S., Chen, S. C., Skinner, D. G., Jones, P. A., Cote, R. J. (1993). p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol*, **143**, 1389-1397.
- Esrig, D., Elmajian, D. Groshen, S., Freeman, J. A., Stein, J. P., Chen, S. C., Nichols, P. W., Skinner, D. G., Jones, P. A., Cote, R. J. (1994). Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*, **331**, 1259-1264.
- Evans, W. C. (1976). Bracken thiaminase-mediated neurotoxic syndromes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 73, 113.
- Evans, W. C. (1986). The acute diseases caused by bracken in animals. In *Bracken, ecology, land use and control technology*. Ed. R. T. Smith & J. A. Taylor. Canforth, Lancashire, Parthenon, pp: 121-132
- Fadl-Elmula, I., Gorunova, L., Gorunova, L., Mandahl, N., Elfving, P., Lundgren, R., Mitelman, F., Heim, S. (2000). Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, **29**, 256-265.
- Fujimoto, K., Yamada, Y., et al.,. (1992). Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res*, **52**, 1393-1398.
- Gibas, Z. and A. A. Sandberg (1984). Chromosomal rearrangements in bladder cancer. *Urology*, **23**, 3-9.
- Goebell, P. J., Groshen, S. G., Schmitz-Dräger, B. J. (2010). International Study-Initiative on Bladder Cancer (ISBC). p53 immunohistochemistry in bladder cancer-a new approach to an old question. *Urol Oncol*, **28**, 377-388.
- Guelstein, V. I., Tchipysheva, T. A. Ermilova, V. D., Troyanovsky, S. M. (1993). Immunohistochemical localization of cytokeratin 17 in transitional cell carcinomas of the human urinary tract. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, **64**, 1-5.
- Hall, P. A., Meek, D., Lane, D. P. (1996). p53--integrating the complexity. *JPathol*, **180**, 1-5.

- Harnden, P., Allam, A., Joyce, A. D., Patel, A., Selby, P., Southgate, J. (1995). Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology*, **27**, 169-174.
- Hartmann, A., Moser, K. Kriegmair, M., Hofstetter, A., Hofstaedter, F., Knuechel, R. (1999). Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol*, **154**, 721-727.
- Hatama, S., K. Nobumoto, et al.,. (2008). Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *J Gen Virol*, **89**, 158-63.
- Hirono, I., I. Ueno, et al.,. (1981). Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. *Cancer Lett*, **13**, 15-21.
- Hirono, I.; Yamada, K.; Niwa, H.; Shizuri, Y.; Ojika, M.; Hosaka, S.; Yamaji, T.; Wakamatsu, K.; Kigoshi, H.; Niiyama, K.; and et al.,. (1984). Separation of carcinogenic fraction of bracken fern. *Cancer Lett*, **21**, 239-246.
- Hirono, I.; Ogino, H.; Fujimoto, M.; Yamada, K.; Yoshida, Y.; Ikagawa, M. and Okumura, M. (1987). Induction of tumors in ACI rats given a diet containing ptaquiloside, a bracken carcinogen. *J Natl Cancer Inst*, **79**, 1143-1149
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sørlie, T., Hovig, E., Smith-Sørensen, B., Montesano, R., Harris, C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3551-3555.
- Howley, P. M. e Lowy, D. R. (2007). Papillomavirus and their replication. In Field's Virology, Knipe D. M. and Howley P. M. (eds). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp: 220.
- IARC (1986). Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) and some of its constituents *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans*, Vol 40, *Some naturally occurring substances and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation* , Lyon, pp. 47-65.
- Kaufmann, O., Volmerig J., and Dietel, M. (2000). Uroplakin III is a highly specific and moderately sensitive immunohistochemical marker for primary and metastatic urothelial carcinomas. *Am J Clin Pathol*, **113**, 683-687.
- Kaufman, D. S., Shipley, W. U., Feldman, A. S. (2009). Bladder cancer. *Lancet*, **374**, 239-249.
- Kelsey, K. T., Hirao, T., Schned, A., Hirao, S., Devi-Ashok, T., Nelson, H. H., Andrew, A., Karagas, M. R. (2004). A population-based study of immunohistochemical detection of p53 alteration in bladder cancer. *Br J Cancer*, **90**, 1572-1576.
- Knowles, M. A. (2006). Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*, **27**, 361-373.
- Knowles, M. A. (2008). Molecular pathogenesis of bladder cancer. *Int J Clin Oncol*, **13**, 287-297.

- Kushida, T., Uesugi, M., Sugiura, Y., Kigoshi, H., Tanaka, H., Hirokawa, J., Ojika, M., and Yamada, K. (1994). DNA damage by ptaquiloside, a potent bracken carcinogen: Detection of selective strand breaks and identification of DNA cleavage products. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 479-486.
- Lane, D. P. (1994). p53 and human cancers. *Br Med Bull*, **50**, 582-99.
- Lee, C. C., Yamamoto, S., Morimura, K., Wanibuchi, H., Nishisaka, N., Ikemoto, S., Nakatani, T., Wada, S., Kishimoto, T., Fukushima, S. (1997). Significance of cyclin D1 overexpression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder and its correlation with histopathologic features. *Cancer*, **79**, 780-789.
- Lioi, M. B., Barbieri, R., Borzacchiello, G., Dezzi, S., Roperto, S., Santoro, A., Russo, V., Roperto, F. (2004). Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic haematuria. *J Comp Pathol*, **131**, 233-236.
- Levidou, G., Sietta, A. A., Karlou, M., Thymara, I., Pratsinis, H., Pavlopoulos, P., Isaiadis, D., Diamantopoulou, K., Patsouris, E., Korkolopoulou, P. (2010). D-type cyclins in superficial and muscle-invasive bladder urothelial carcinoma: correlation with clinicopathological data and prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol*, **136**, 1563-71.
- Luis, N. M., Lopez-Knowles, E., Real, F. X. (2007). Molecular biology of bladder cancer. *ClinTransl Oncol*, **9**, 5-12.
- Marrero, E., C. Bulnes, et al.,. (2001). *Pteridium aquilinum* (bracken fern) toxicity in cattle in the humid Chaco of Tarija, Bolivia. *Vet Hum Toxicol*, **43**, 156-158.
- Matsumoto, K., Satoh, T., Irie, A., Ishii, J., Kuwao, S., Iwamura, M., Baba, S. (2008). Loss expression of uroplakin III is associated with clinicopathologic features of aggressive bladder cancer. *Urology*, **72**, 444-449.
- Maxie, M. G., and Newman, S. J. (2007). Urinary Sistem. In: Maxie, M. G. (Ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals* (5th ed.).(pp 425- 522). London: Elsevier Ltd.
- McKenzie, R. A. (1978). Bovine enzootic haematuria in Queensland. *Aust Vet J*, **54**, 61-64.
- Meuten, D. J. (2002). Tumors in Domestic Animals. In D. J. Meuten (Ed.),. *Tumors of the urinary system* (4th ed.). (pp 509-546). Iowa: Iowa State Press.
- Meuten, D. J., Everitt, J., Inskeep, W., Jacobs, R. M., Peleteiro, M., Thompson, K. G. (2004). WHO Histological Classification of Tumors of the Urinary Sistem of Domestic Animals. *Armed Forces Institute for Pathology*, Second Series, Vol. **XI**. Washington, DC.
- Miller, E. C. and J. A. Miller (1986). Carcinogens and mutagens that may occur in foods. *Cancer* **58** 8 Supp: 1795-803.

- Mitra, A. P., Datar, R. H., Cote, R. J. (2006). Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *J Clin Oncol*, **24**, 5552-5564.
- Mitra, A. P. and Cote, R. J. (2009). Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annu Rev Pathol*, **4**, 251-285.
- Mitra, A. P. and Cote, R. J. (2010). Molecular screening for bladder cancer: progress and potential. *Nat Rev Urol*, **7**, 11-20.
- Miyamoto, H., Yang, Z., Chen, Y.-T., Ishiguro, H., Uemera, H., Kubota, Y., Nagashima, Y., Chang, Y.-J., Hu, Y.-C., Tsai, M.-Y., Yeh, S., Messing, E. M. and Chang, C. (2007). "Promotion of Bladder Cancer Development and Progression by Androgen Receptor Signals." *J. Natl. CancerInst.*, **99**, 558-568.
- Moll, R., Achtstatter, T., Becht, E., Balcarova-Ständer, J., Ittensohn, M., Franke, W. W. (1988). Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. Maintenance of expression of urothelial differentiation features in transitional cell carcinomas and bladder carcinoma cell culture lines. *Am J Pathol* **132**, 123-144.
- Moll, R., Lowe, A., Laufer, J., Franke, W. W. (1992). Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol*, **140**, 427-447.
- Moll, R., Wu, X. R., Lin, J. H., and Sun, T. T. (1995). Uroplakins, specific membrane proteins of urothelial umbrella cells, as histological markers of metastatic transitional cell carcinomas. *Am J Pathol*, **147**, 1383-1397.
- Moll, R. (1998). Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell Biochem*, **31**, 205-262.
- Mostofi, F. K., Davis, C. J. and Sesterhenn, I. A. (1999). WHO Histological Typing of Urinary Bladder Tumours. *Springer-Verlag, Berlin, Germany* 2nd Edit., **Vol. 10**.
- Mugera, G. M. and P. Nerito (1968). Tumours of the urinary bladder and liver associated with enzootic haematuria in Kenyan cattle. *Vet Rec*, **83**, 457-459.
- Nandi, S. N. (1969). Histopathology of enzootic bovine haematuria in the Darjeeling District of India. *Br Vet J*, **125**, 587-590.
- Nishizaki, M., Fujiwara, T., Tanida, T., Hizuta, A., Nishimori, H., Tokino, T., Nakamura, Y., Bouvet, M., Roth, J. A., Tanaka, N. (1999). Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic: a proposed mechanism for bystander effect. *Clin Cancer Res*, **5**, 1015-1023.
- Niwa, H.; Ojikia, M.; Wakamatsu, K.; Yamada, K.; Ohba, S.; Saito, Y.; Hirono, I. (1983). The glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *Latiusculum*. *Tetrahedron Letters*, **24**, 5371-5372.

- Obermann, E. C., Junker, K., Stoehr, R., Dietmaier, W., Zaak, D., Schubert, J., Hofstaedter, F., Knuechel, R., Hartmann, A. (2003). Frequent genetic alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder cancer as detected by CGH, LOH, and FISH analyses. *J Pathol*, **199**, 50-57.
- Ohtsuka, Y., Kawakami, S., Fujii, Y., Koga, F., Saito, K., Ando, N., Takizawa, T., Kageyama, Y., and Kihara, K. (2006). Loss of uroplakin III expression in associated with a poor prognosis in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *BJU International*, **97**, 1322-1326.
- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C., Hainaut, P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*, **19**, 607-614.
- Olson, C., Pamukcu, A. M., Brobst, D. F. (1965). Papilloma-like virus from bovine urinary bladder tumors. *Cancer Research*, **25**, 840-847
- Ozkul, I. A. and Y. Aydin (1996). Tumours of the urinary bladder in cattle and water buffalo in the Black Sea region of Turkey. *Br Vet J*, **152**, 473-475.
- Pamukcu, A. M., Göksoy, S. K., Price, J. M. (1967). Urinary bladder neoplasms induced by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*) to cows. *Cancer Research*, **27**, 917-924.
- Pamukcu, A. M., E. Erturk, et al., (1976). Histogenesis of urinary bladder cancer induced in rats by bracken fern. *Invest Urol*, **14**, 213-218.
- Pamukcu, A. M., S. Yalciner, et al., (1980). Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res*, **40**: 3468-3472.
- Parrish, C. R. (2011). Papillomaviridae and Polyomaviridae. In *Fenner Veterinary Virology* (4th ed.). MacLachlan, N. J. and Dubovi, E. J. (eds). Elsevier Inc., San Diego.
- Parry, D. A. and Steinert, P. M. (1999). Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q Rev Biophys*, **32**, 99-187.
- Peixoto, P. V., França, T. N., Barros, C. S. L., Tokarnia, C. H. (2003). Histopathological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* **23**, 65-81.
- Pinto, C. A.; Lima, R., Louza, A. C.; Almeida, V.; Melo, M.; Vaz, Y.; Neto-Fonseca, I.; Lauren D. R.; e Smith, B. L. (2000). Bracken fern induce bovine enzootic haematuria in São Miguel Island, Azores. In *Bracken fern: toxicity, biology and control. Proc. of the International Bracken Group Conference*. Manchester, 1999. Ed. J A Taylor and R T Smith, pp: 136-140.
- Pinto, A. C.; Januario, T.; Geraldles, M.; Lauren, D. R.; Smith, B.L.; and Robinson, R. C. (2004). Bovine enzootic haematuria on Sao Miguel Island, Azores. In: *Poisonous Plants and Related Toxins*, T. Acamovi, C. S. Stewart and T. W. Pennycott, Eds, CAB International, Oxon, UK, 564-574

- Pinto, C. A.; Machado, J.; Carvalho, T.; Fernandes, I.; Peleteiro, M. C. (2005). Etiopathogenic studies of bovine enzootic haematuria in São Miguel, Azores. *Proceedings of the III Meeting of the Portuguese Society of Veterinary Sciences, Lisbon, Portugal*, pp.25
- Pinto, C. A. (2010). Hematúria Enzoótica Bovina: Contribuição para o seu estudo Etiopatogénico. Dissertação de Doutoramento em Sanidade Animal. Lisboa Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Povey, A. C., Evans, I. A., Taylor, J. A. and O'Connor, P. J. (1994). Detection of DNA adducts by 32P-postlabelling in Mice Treated with Bracken Extract and Bracken Spores. In *Bracken: an Environmental Issue*. Eds. Smith R. & Taylor, J. A. International Bracken Group. Aberystwyth. Special Publication nº2: 95-98
- Prakash, A. S., Pereira, T. N., Smith, B. L., Shaw, G., Seawright, A. A. (1996). Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. *Nat Toxins*, **4**, 221-227.
- Puzio-Kuter, A. M., Castillo-Martin, M., Kinkade, C. W., Wang, X., Shen, T. H., Matos, T., Shen, M. M., Cordon-Cardo, C., Abate-Shen, C. (2009). Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev*, **23**, 675-680.
- Ramos-Vara, J. A., Miller, M. A., Boucher, M., Roudabush, A., and Johnson, G. C. (2003). Immunohistochemical Detection of Uroplakin III, Cytokeratin 7, and Cytokeratin 20 in Canine Urothelial Tumors. *Vet Pathol*, **40**, 55-62.
- Resendes, A. R., Roperto, S., Trapani, F., Urraro, C., Roperto, F., Borzacchiello, G. (2010). Association of bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) and urinary bladder tumours in cattle from the Azores archipelago. *Res Vet Sci.*, doi: 10.1016/j.rvs.2010.02.001.
- Romih, R., Jezernik, K., Masera, A. (1998). Uroplakins and cytokeratins in the regenerating rat urothelium after sodium saccharin treatment. *HistochemCell Biol*, **109**, 263-269.
- Roperto, S., Ambrosio, V., Borzacchiello, G., Galati, P., Paciello, O., Russo, V., and Roperto F. (2005). Bovine papillomavirus type-2 (BPV-2) infection and expression of uroplakin IIIb, a novel urothelial cell marker, in urinary bladder tumors of cows. *Vet Pathol*, **42**, 812-818.
- Roperto, S., Borzacchiello G., et al.,. (2009). A review of bovine urothelial tumours and tumour-like lesions of the urinary bladder. *J Comp Pathol*, **142**, 95-108.
- Schaafsma, H. E., Ramaekers, F. C., van Muijen, G. N., Ooms, E. C., Ruiter, D. J. (1989). Distribution of cytokeratin polypeptides in epithelia of the adult human urinary tract. *Histochemistry*, **91**, 151-159.
- Schulz, W. A. (2006). Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways. *Int J Cancer*, **119**, 1513-1518.

- Shahin, M., Smith, B. L., Worrall, S., Moore, M. R., Seawright, A. A. and Prakash, A. S. (1998). Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF alpha levels, and mammary gland carcinoma in rats. *BiochemBiophys Res Commun*, **244**, 192-197
- Shariat, S. F., Ashfaq, R., Sagalowsky, A. I., Lotan, Y. (2006). Correlation of cyclin D1 and E1 expression with bladder cancer presence, invasion, progression, and metastasis. *Human Pathology*, **37**, 1568-1576.
- Shariat, S. F., Ashfaq, R., Zlotta, A. R., Sagalowsky, A. I., and Lotan, Y. (2007). Association of cyclin D1 and E1 expression with disease progression and biomarkers in patients with nonmuscle-invasive urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol*, **25**, 468-475.
- Sharma, S., Ksheersagar, P., Sharma, P. (2009). Diagnosis and treatment of bladder cancer. *Am Fam Physician*, **80**, 717-723.
- Sherr, C. J. (2000). Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect*, **96**, 73-92.
- Shiina, H., Igawa, M., Shigeno, K., Terashima, M., Deguchi, M., Yamanaka, M., Ribeiro-Filho, L., Kane, C. J., Dahiya, R. (2002). Beta-catenin mutations correlate with over expression of C-myc and cyclin D1 Genes in bladder cancer. *J Urol*, **168**, 2220-2226.
- Silva, L. F. D. (2001). Plantas vasculares invasoras no Arquipélago dos Açores. Caracterização geral e estudo de um caso: *Clethra arborea* Aiton (Cletheraceae). Dissertação apresentada à Universidade dos Açores para a obtenção do grau de Doutor na Área de Biologia, Especialidade de Ecologia Vegetal. Universidade Dos Açores. Ponta Delgada, 541 pp.
- Silverman, D. T., Hartge, P., Morrison, A. S., Devesa, S. S., (1992). Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, **6**, 1-30.
- Simon, R., Struckmann K., et al.,. (2002). Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. *Oncogene*, **21**, 2476-2483.
- Slaton, J. W., Benedict, W. F., Dinney, C. P. (2001). P53 in bladder cancer: mechanism of action, prognostic value, and target for therapy. *Urology*, **57**, 852-859.
- Smith, B. L. (1990). Bracken fern and animal health in Austrália and New Zealand. In: *Bracken Biology and Management*. Eds. Thompson, J. A. & Smith, R. T. Australian Institute of Agricultural Science, Sidney, 241-246.
- Smith, B. L.; Lauren, D. R.; Embling, P. P. e Agnew, M. (1993). Carcinogenicity of bracken fern (*Pteridium* spp.) in relationship to grazing ruminants In: *Proceedings of the 17th International Grassland Congress*. Eds. Broughan, J. New Zealand Grassland Association, 1396
- Smith, B. L., Shaw, G., Prakash, A. S., and Seawright, A. A. (1994). Studies on DNA adduct formation by ptaquiloside, the carcinogen of bracken ferns (*Pteridium* spp.). In *Plant Associated Toxins*. Colgate, S. M., and Dorling, P. R., Eds., CAB International, Wallingford, UK. Chap. 31, pp. 167-172.

- Smith, B. L. and Seawright, A. A. (1995). Bracken fern (*Pteridium* spp.) carcinogenicity and human health – A brief review, *Natural Toxin*, **3**; 1-5.
- Smith, B. L. (1997). The toxicity of bracken fern (genus *Pteridium*) to animals and its relevance to man. In *Handbook of Plant and Fungal Toxicants* Felix D'Mello (ed.) CRC press, Boca Raton: 63-76
- Smith, N. D., Rubenstein, J. N., Eggener, S. E., Kozlowski, J. M. (2003). The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J Urol*, **169**, 1219-1228.
- Smith, B. L. e Pinto, C. A. (2006). Bracken (genus *Pteridium*) and its carcinogen, ptaquiloside as a worldwide cause of animal health problems. *Proceedings of the International Symposium Intractable Weeds & Plant Invaders*. Universidade dos Açores, Ponta Delgada: 13-14
- Sobin, L. H. and Fleming, I. D. (1997). TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*, **80**, 1803-1804.
- Southgate, J., Harnden, P., Trejdosiewicz, L. K. (1999). Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol*, **14**, 657-664.
- Spruck, C. H., 3rd, Ohneseit, P. F., Gonzalez-Zulueta, M., Esrig, D., Miyao, N., Tsai, Y. C., Lerner, S. P., Schmitt, C., Yang, A. S., Cote, R., et al., (1994). Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, **54**, 784-788.
- Staehelin, L. A., Chlapowski, F. J., Bonneville, M. A. (1972). Lumenal Plasma Membrane of the Urinary Bladder: I. Three-Dimensional Reconstruction from Freeze-Etch Images. *J. Cell Biol.*, **53**, 73-91.
- Stein, J. P., Ginsberg D. A., et al., (1998). Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 1072-1079.
- Stopper, H. E. Schmitt, et al., (2005). Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **574**: 139-155.
- Sullivan, P. S., Chan, J. B., Levin, M. R., Rao, J. (2010). Urine cytology and adjunct markers for detection and surveillance of bladder cancer. *Am J Transl Res*, **2**, 412-440.
- Sun T-T, L. F.-X., Wu, X.-R. (1996). Uroplakins as markers of urothelial differentiation. In: *Advances in Bladder Research*, ed. Baskin LS, Hayward SW, pp. 7-18. Plenum Publishers Corporation, New York, NY, 1999.
- Tomita, Y., I. Literak, et al., (2007). Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes*, **35**, 243-249.

- Uchida, T., C. Wada, et al., (1995). p53 mutations and prognosis in bladder tumors. *J Urol*, **153**, 1097-1104.
- Van, Q. N., Veenstra, T. D., Issaq, H. J. (2011). Metabolic profiling for the detection of bladder cancer. *Curr Urol Rep*, **12**, 34-40.
- Van der Hoeven, L. C. M.; Lagerweig, W. J.; Posthumus, M. A.; Van Veldhuizen, A.; Holterman, H. A. J. (1983). Aquilide A, a New Mutagenic Compound Isolated from Bracken Fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). *Carcinogenesis*, **4**, 1587-1590
- Veranic, P. and Jezernik, K. (2002). Trajectorial organisation of cytokeratins within the subapical region of umbrella cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **53**, 317-325.
- Veranic, P. and Jezernik, K. (2006). The Cytokeratins of Urinary Bladder Epithelial Cells. *Asian Journal of Cell Biology*, **1**, 1-8.
- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, **2**, 594-604.
- White, R. N. (2003). Tumors of the urogenital tract. In J. M. Dobson and B. C. X. Lascelles (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. (2nd), (pp 245-248). Gloucester: BSAVA
- Wosiacki, S. R., M. A. Barreiro, et al., (2005). Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J Virol Methods*, **126**, 215-9.
- Wu, X. R., Manabe, M., Yu, J. Sun T. T. (1990). Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation. *J Biol Chem*, **265**, 19170-19179.
- Wu, X. R., Lin, J. H., Walz, T., Haner, M., Yu, J., Aebi, U., and Sun, T. T. (1994). Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. *J Biol Chem*, **269**, 13716-13724.
- Xu, L. R. (1992). Bracken poisoning and enzootic haematuria in cattle in China. *Res Vet Sci*, **53**, 116-21.
- Yamada, K., Ojika, M., Kigoshi, H. (2007). Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Nat Prod Rep*, **24**, 798-7813.
- Yutkin, V., Nisman, B., Pode, D. (2010). Can urinary biomarkers replace cystoscopic examination in bladder cancer surveillance? *Expert Rev Anticancer Ther*, **10**, 787-790.
- zur Hausen, H. and E. M. de Villiers (1994). Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol*, **48**, 427-47.

ANEXOS

ANEXO I. Protocolo da técnica de coloração Hematoxilina & Eosina:

1. Xilol, 15 min,
2. Passar 3 vezes em álcool etílico absoluto,
3. Passar 3 vezes em álcool etílico 90°,
4. Passar 3 vezes em Álcool etílico 70°,
5. Lavar bem em água destilada,
6. Hematoxilina de Ehrlich, 10 min,
7. Passar 1 vez em água destilada,
8. Álcool clorídrico 1% em álcool a 70°, 1 passagem,
9. Água destilada, 1 passagem,
10. Água comum até escurecer, cerca de 2 min,
11. Eritrosina, 2 min,
12. Uma passagem em água destilada,
13. Álcool etílico 70°, 3 passagens,
14. Álcool etílico a 90°, 3 passagens,
15. Álcool absoluto, 5 min,
16. Xilol, 5 min,
17. Montagem em resina sintética (Entellan[®])

ANEXO II. Protocolo da técnica de coloração imuno-histoquímica utilizada:

1. Desparaafinar e hidratar os cortes.
2. Recuperação antigénica de acordo com as especificações expressas na Tabela 3.
3. Lavar as lâminas em PBS, por 3 vezes 5 min.
4. Incubar com Solução de Bloqueio de Reacções Inespecíficas à temperatura ambiente 30 min.
5. Retirar excesso de Solução de Bloqueio.
6. Incubar com o Soro Primário de acordo com as especificações expressas na Tabela 3.
7. Lavar as lâminas em PBS, por 3 vezes 5 min.
8. Incubar com Solução de Bloqueio da Peroxidase Endógena (H₂O₂ a 3% em água corrente) 10 min.
9. Lavar as lâminas em PBS, por 3 vezes 5 min.
10. Incubar com Anticorpo Secundário de acordo com as especificações expressas na Tabela 3.
11. Lavar as lâminas em PBS, por 3 vezes 5 min.
12. Incubar com Reagente ABC 30 min.
13. Lavar as lâminas em PBS, por 3 vezes 5 min.
14. Revelar com diaminobenzidina 3 min.
15. Lavar as lâminas em água corrente.
16. Efectuar o contraste nuclear com Hematoxilina de Mayer 30s.
17. Lavar em água corrente (azular).
18. Desidratar os cortes e montar as lâminas com lamela e meio de montagem apropriado.